



**MARK ANTHONY
MONTEIRO SIMÕES**

Nº. Mec.: 65164

***Pterospartum tridentatum*: Estudo fitoquímico e
avaliação das atividades biológicas dos seus
compostos**



**MARK ANTHONY
MONTEIRO SIMÕES**

Nº. Mec.: 65164

***Pterospartum tridentatum*: Estudo fitoquímico e
avaliação das atividades biológicas dos seus
compostos**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, ramo de Métodos Biomoleculares realizada sob a orientação científica do Doutor Artur M. S. Silva, Professor Catedrático do Departamento de Química na Universidade de Aveiro, e do Doutor Bruno Miguel Rodrigues das Neves, Professor Auxiliar convidado da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Dedico este trabalho ao meu pai, à minha mãe, ao meu irmão e ao meu marido Ryan pelo apoio, amor e dedicação que me deram durante estes anos de estudo. Quero também agradecer o apoio do Professor Artur M. S. Silva e do Professor Bruno M. R. das Neves, pois foi graças a eles que este trabalho foi possível.

O Júri

presidente

Doutor Francisco Manuel Lemos Amado

Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor Artur Manuel Soares da Silva

Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Ana Maria Loureiro da Seca

Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade dos Açores

palavras-chave

Pterospartum tridentatum, atividade anti-inflamatória, atividade anti-acetilcolinesterase.

resumo

O *Pterospartum tridentatum* é um arbusto usado na medicina tradicional Portuguesa no tratamento de vários problemas de saúde. Existe, no entanto, pouca informação na literatura que suporte cientificamente os efeitos que lhe são atribuídos. Assim, este trabalho visou isolar novos compostos da raiz, do caule e das folhas do arbusto *Pterospartum tridentatum*, sendo posteriormente feita a avaliação *in vitro* da sua atividade anti-inflamatória e *in chemico* da atividade anti-acetilcolinesterase, de modo a comprovar o seu uso na medicina tradicional. Foram preparados os extratos etanólicos destas três secções e feita a sua caracterização usando UHPLC-MS-ESI/MSⁿ. Procedeu-se também ao isolamento de 3 flavonoides prenilados dos extratos da raiz, sendo um deles isolado pela primeira vez. O potencial anti-inflamatório dos extratos das diferentes secções foi avaliado *in vitro* em macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). Foi avaliado o efeito a nível da produção de óxido nítrico NO, da expressão das proteínas iNOS e COX-2 e da transcrição de vários genes pró-inflamatórios como *Il1*, *Nos2*, *Il6*, *Ptgs2* e *Tnfa*. Atendendo aos dados obtidos verificou-se que todos os extratos inibem significativamente a produção de NO induzida pelo LPS, em resultado de uma diminuição da transcrição do gene *Nos2* e da consequente expressão da enzima por iNOS por ele codificada. Verificou-se também que todos os extratos exibem atividade antioxidante significativa a nível celular. O extrato do caule mostrou ainda inibir a expressão de COX-2 induzida pelo LPS, sendo este efeito devido a uma diminuição da transcrição do respetivo gene *Ptgs2*. Adicionalmente, foi possível verificar que todos os extratos inibem significativamente a transcrição da citocina inflamatória IL-1 β . Quanto á atividade anti-acetilcolinesterase não foi possível verificar se os extratos apresentam atividade inibidora relevante. Em suma, os extratos têm características anti-inflamatórias que suportam alguns dos usos da *Pterospartum tridentatum* na medicina tradicional.

keywords

Pterospartum tridentatum, anti-inflammatory activity, anti-acetylcholinesterase activity.

abstract

Pterospartum tridentatum is a shrub used in Portuguese traditional medicine for the treatment of various health problems. However, there is little information in the literature that scientifically supports the effects attributed to it. Thus, this work aims to isolate new compounds from the root, stem and leaves and to evaluate *in vitro* the anti-inflammatory activity and *in chemico* anti-acetylcholinesterase activity, in order to prove their use by traditional medicine. The ethanolic extracts of these three sections were prepared and the characterization was performed using UHPLC-MS-ESI/MSⁿ. It was also possible to isolate 3 prenylated flavonoids from the root extract, one of them being isolated for the first time. The anti-inflammatory potential of the extracts from the different sections was evaluated *in vitro* on bacterial lipopolysaccharide (LPS) stimulated macrophages. The effect on the production of nitric oxide NO, the expression of the iNOS and COX-2 proteins and the transcription of several pro-inflammatory genes like *Il1*, *Nos2*, *Ptgs2* and *Tnfa* were evaluated.

Based on the data obtained, it was verified that all the extracts significantly inhibit the NO production induced by LPS, because of a decrease in the transcription of the *Nos2* gene and the consequent expression of the enzyme by iNOS encoded by it. We also found that all extracts show significant antioxidant activity at the cellular level. The extract of the stem also showed to inhibit the expression of COX-2 induced by LPS, being this effect due to a decrease of the transcription of the respective gene *Ptgs2*. Additionally, it was possible to verify that all the extracts significantly inhibit the transcription of the inflammatory cytokine IL-1 β . As for the anti-acetylcholinesterase activity, it wasn't possible to verify if the extracts present a relevant inhibitory activity. In sum, the extracts have anti-inflammatory and anti-acetylcholinesterase characteristics that support some of the uses of *Pterospartum tridentatum* in traditional medicine.

Índice

1. Introdução	1
2. <i>Pterospartum tridentatum</i>	1
2.1 Atividade anti-inflamatória.....	5
2.2 Atividade anti-acetilcolinesterase	9
3. Objetivos:	13
4. Material e métodos.....	13
4.1 Material vegetal e preparação dos extratos.....	13
4.2 Análise por Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massa	14
4.3 Extração e isolamento.....	14
4.4 Análise dos Extratos usando UHPLC-MS-ESI/MS ⁿ	21
4.5 Cultura de células	21
4.6 Ensaio de viabilidade celular	22
4.7 Avaliação da produção de óxido nítrico	22
4.8 Determinação da atividade <i>scavenging</i> de óxido nítrico	22
4.9 Análise de <i>Western Blotting</i>	23
4.10 Avaliação do potencial anti-oxidante <i>in vitro</i>	24
4.11 Avaliação da transcrição de genes inflamatórios por qPCR.....	24
4.12 Avaliação da atividade anti-acetilcolinesterase	25
5. Resultados e discussão	25
5.1 Isolamento de compostos da raiz.....	25
5.2 Caracterização dos extratos por UHPLC-MS.....	36
5.3 Atividade biológica dos extratos	42
5.3.1 Efeitos dos extratos etanólicos da raiz, do caule e da folha na viabilidade celular.....	42
5.3.2. Avaliação da produção de NO, potencial atividade <i>scavenging</i> e atividade antioxidante.....	45

5.3.3.	Efeito dos extratos etanólicos na expressão proteica de iNOS e COX-2.....	49
5.3.4.	Efeito dos extratos etanólicos na transcrição dos genes inflamatórios <i>Nos2</i> , <i>Ptgs2</i> , <i>Il1b</i> , <i>Il6</i> e <i>Tnfa</i>	52
5.4.	Atividade Anti-acetilcolinesterase.....	55
6.	Conclusões	57
7.	Referências Bibliográficas	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de um dos mecanismos do processo inflamatório. As moléculas adaptadoras TIRAP e MyD88¹ traduzem o sinal recebido pelo TLR², após o reconhecimento de um agente patogénico, iniciando a cascata de eventos que leva à ativação do NF-κB e da sua translocação para o núcleo. Por outro lado, a TRAF6 leva à ativação das MAPKs, ativando a Erk1/2, a JNK ou a p38, que levam à translocação da AP-1 para o núcleo, um fator de transcrição que controla a diferenciação, proliferação e apoptose celular. 7

Figura 2: Processo amiloidogénico e não amiloidogénico. A enzima β-secretase cria um fragmento insolúvel que se complexa entre si para formar placas senis no meio extracelular. Estes formam complexos com a acetilcolina que aumenta a formação de agregados Aβ^{74,75}, criando um sistema de feedback positivo..... 12

Figura 3: Imagem da montagem de Soxhlet em funcionamento com uma amostra. A legenda da figura é: 1 – condensador; 2 – mangueira com saída de água; 3 – mangueira com entrada de água; 4 – câmara de Soxhlet; 5 – cartuxo com a amostra; 6 – balão de fundo redondo; 7- manta de aquecimento;..... 16

Figura 4: Fluxograma das massas obtidas pelo fracionamento do extrato da raiz (R)..... 17

Figura 5: Fluxograma das massas obtidas do fracionamento da fração de hexano da raiz (RH);..... 18

Figura 6: Fluxograma das massas obtidas do fracionamento da fração de diclorometano da raiz (RH). As restantes massas são RD11 (219 mg), RD12 (34 mg), RD13 (48 mg), RD14 (68 mg), RD15 (23 mg), RD16 (4 mg), RD17 (5 mg), RD18 (126 mg), RD19 (26 mg), RD20 (13 mg), RD21 (11 mg), RD22 (1 mg), RD23 (147 mg), RD24 (54 mg), RD25 (44

mg), RD26 (75 mg), RD27 (22 mg), RD28 (18 mg), RD29 (31 mg), RD30 (9 mg), RD31 (12 mg).....	mg)	e	RD32	(5 mg).....	20
---	-----	---	------	-------------	----

Figura 7: Identificação dos carbonos e protões na elucidação da estrutura do composto lupinifolina. A – identificação do anel A e C do flavonoide baseado no espectro de HMBC e da ligação de hidrogénio do grupo 5-hidroxilo; B – identificação da unidade pirano da estrutura; C – identificação da cadeia prenilo; D – identificação do anel aromático; E – estrutura da lupinifolina com todos os carbonos numerados.....	28
--	----

Figura 8: Estrutura do composto lupinifolina com as correlações HMBC (azul) e COSY (verde).....	29
--	----

Figura 9: Identificação dos respetivos carbonos e protões na elucidação da estrutura do composto mundulina. A – identificação do anel A e C do flavonoide baseado no RMN HMBC e da ponte de hidrogénio criado pelo grupo hidroxilo do anel A; B – identificação da unidade pirano da estrutura; C – identificação da cadeia prenilo; D – identificação do anel aromático; E – estrutura final com todos os carbonos numerados;.....	31
--	----

Figura 10: Estrutura do composto mundulina com as correlações HMBC (azul) e COSY (verde).....	32
--	----

Figura 11: Estrutura do composto 3 com os devidos carbonos identificados, consoante a sua nomenclatura.....	34
--	----

Figura 12: Estrutura do composto 3 com as correlações HMBC (azul) e COSY (verde).....	34
--	----

Figura 13: Efeito dos extratos na viabilidade das células RAW 264.7. A viabilidade encontra-se representada em termos de percentagem relativamente às células não tratadas (controlo), considerado 100%.

..... 44

Figura 14: Efeito dos diferentes extratos de *Pterospartum tridentatum* na produção de NO induzida por LPS em macrófagos. Células RAW foram tratadas com 100 µg/mL de cada extrato durante 1h sendo posteriormente expostas a 1 µg/mL de LPS por mais 24 h. No final foi avaliada a concentração de nitritos no meio (um reflexo do NO produzido) pelo método de Griess. Os dados apresentados representam a média +/- desvio padrão de 3 experiências independentes. Comparação entre grupos foi feita por aplicação de teste ANOVA com pós teste Dunnett (####P<0,001; C vs extrato; #####P<0,0001; C vs LPS; ****P<0,0001; LPS vs

extratos+LPS)..... 46

Figura 15: Efeito dos diferentes extratos de *Pterospartum tridentatum* na concentração de NO (em µM) libertado pelo SNAP, em condições fisiológicas. O meio de cultura foi tratado com 300 µM de SNAP e 100 µM de extrato e mantidas a 37°C durante 3 h. A concentração de nitritos no meio foi determinada pela reação de Griess..... 47

Figura 16: Intensidade de fluorescência emitida pelas células macrófagos RAW 264.7 tratadas com *N*-acetilcisteína (controlo positivo) ou extrato etanólico de *Pterospartum tridentatum* após ter sido induzido estresse oxidativo com LPS. As células foram analisadas com um microscópio fluorescente com ampliação de 63X. Comparação entre grupos foi feita por aplicação de teste T para comparar o C vs LPS (####P<0,0001) e um teste ANOVA com pós-teste Dunnett para comparar o LPS vs extratos+LPS (****P<0,0001)..... 48

Figura 17: Efeito dos extrato etanólicos de *Pterospartum tridentatum* na expressão proteica de iNOS e COX-2 induzida por LPS em macrófagos RAW 264.7. Extratos

celulares das diferentes condições foram separados eletroforeticamente em géis SDS-PAGE 12% e sujeitos a Western blot para avaliação da expressão de iNOS e COX-2. A comparação entre grupos foi feita por aplicação de teste T para comparar o C vs LPS (####P<0,0001) e um teste ANOVA com pós-teste Dunnett para comparar o LPS vs extratos+LPS (*P<0,05; ****P<0,0001)..... **50**

Figura 18: Efeito dos extratos etanólicos do *Pterospartum tridentatum* na transcrição dos genes inflamatórios *Il1b*, *Nos2*, *Ptgs2*, *Il6* e *Tnfa* induzidos por LPS. Células RAW 264.7 foram tratadas com 100 µg/ml de cada extrato durante 1h sendo posteriormente expostas a 1 µg/ml de LPS por mais 24h. O ARN foi extraído e retrotranscrito sendo posteriormente analisada a transcrição dos genes *Il1b*, *Nos2*, *Ptgs2*, *Il6* e *Tnfa* por qPCR. Comparação entre grupos foi feita por aplicação de teste T para comparar o C vs LPS (##P<0,01) e um teste ANOVA com pós-teste Dunnett para comparar o LPS vs extratos+LPS (*P<0,05; ****P<0,0001)..... **54**

Figura 19: Efeito dos extratos etanólicos do *Pterospartum tridentatum* na actividade acetilcolinesterase *in chemico*. A leitura das absorvâncias da mistura enzima+extrato foi lida aos 0s, 150s, 300s e 450s, sendo estes valores usados para calcular a percentagem de inibição..... **56**

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA	Ácido araquidónico
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AP-1	Proteína ativadora-1
ARN	Ácido ribonucleico
ATChI	Iodeto da acetiltiocolina
Aβ	Beta amilóide
BCh	Butirilcolina
BChE	Butirilcolinesterase
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
c-JUN	Proto-oncogene Jun
COSY	Correlação espectroscópica homonuclear, bidimensional, em RMN
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
DA	Doença de Alzheimer
DTNB	Reagente de Ellman
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HMBC	Correlação espectroscópica heteronuclear a longa distância, bidimensional em RMN (<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>)
HSQC	Correlação espectroscópica heteronuclear, bidimensional, em RMN (<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>)
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
iNOS	óxido nítrico sintase indutível
IRF	Fator regulador de interferão 3
IκBα	Fator nuclear kapa B inibidor alfa
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espetrometria de Massa
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
MAP2	Proteína associada ao microtúbulo 2
MAPK	Proteína cinase ativada por mitogénio
MAPT	α -metil- <i>p</i> -tirosina
MyD88	Resposta primária de diferenciação mielóide 88
NF-κB	Fator nuclear kapa B
NO	Óxido nítrico
p50 (NF-κB B1)	Fator nuclear kappa B subunidade 1
P65 (RelA)	Fator de transcrição p65

PAMP	Padrão molecular associado a um agente patogénico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGE₂	Prostaglandina E2
PI3K/Akt	Fosfoinosítídeo 3-cinase/Proteína cinase B
PKC	Proteína cinase C
ppm	Partes por milhão
PRR	Recetor de reconhecimento de padrões
Rel	Oncogene reticuloendoteliose
RIPA	Tampão de ensaio radioimunoprecipante
RMN	Ressonância magnética nuclear
sAPPα	Proteína precursora da amiloide alfa solúvel
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNAP	S-nitroso-N-acetilpenicilamina
SNC	Sistema nervoso central
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
TIRAP	Proteína adaptador contendo domínio do recetor interleucina-1
TLC	<i>Cromatografia de Camada Fina</i>
TLR	<i>Toll-like</i> receptors
TMS	Tetrametilsilano
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
TRAF6	Fatores associados ao recetor do fator de necrose tumoral
TRH	Terapia de Reposição Hormonal
TXA₂	Tromboxano A2
UHPLC-MS-ESI/MSⁿ	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado a um espectrómetro de massa com ionização por <i>electrospray</i>
u.m.a	Unidade de massa atómica

1. Introdução

As plantas desenvolveram ao longo do seu processo evolutivo formas de sobrevivência no seu meio ambiente, tirando muita das vezes partido dos metabolitos intermediários do metabolismo primário – metabolitos secundários. Estes compostos garantem a sobrevivência do organismo que o produz e apresentam normalmente atividades biológicas relevantes. Estas atividades levam a que produtos naturais sejam usados em diversas indústrias, como fonte de agentes antioxidantes³, antifúngicos⁴, antibacterianos^{5,6}, entre muitos outros⁷⁻⁹. Inúmeras plantas são usadas desde a antiguidade para o tratamento de doenças que acometem o ser humano. Estima-se que nos dias de hoje cerca de 80% da população mundial¹⁰ utiliza formulações medicinais tradicionais. Cerca de 50% dos fármacos em circulação são direta ou indiretamente derivados de compostos de origem natural¹¹.

2. *Pterospartum tridentatum*

Há uma grande quantidade de plantas com propriedades medicinais que são usadas em várias partes do mundo, contudo os seus constituintes ativos e mecanismos de ação são frequentemente desconhecidos. Um exemplo desta situação é a planta portuguesa *Pterospartum tridentatum*.

Pterospartum tridentatum (Spach) K. Koch [= *Chamaespartium tridentatum* (L.) P. Gibbs.; *Genista tridentata* L.] é um arbusto endémico da Península Ibérica pertencente à subfamília Papilionoideae e à família Fabaceae¹², localmente conhecido como carqueja, carqueija, flor-de-carqueja ou querqueijeira. A *P. tridentatum* é conhecida em muitas regiões como “a planta que cura tudo”¹³ e tem muitas aplicações na medicina tradicional, onde são utilizadas infusões das flores, folhas e dos caules secos. Esta planta foi descrita pela primeira vez por Koch (1996)¹² como *Pterospartum* através das descrições de Spach (1977), que tinha considerado esta planta como *Genista*. Também foi descrita como *Chamaespartium* por Franco (1971), mas após consideração *Pterospartum* tornou-se um táxon monotípica pertencente à tribo *Cytiseae* e à subtribo *Genistinae*. A espécie *Pterospartum tridentatum* é composta por três subespécies¹⁴: subsp. *tridentatum*, subsp. *cantabricum* e subsp. *lasianthum*. As diferenças

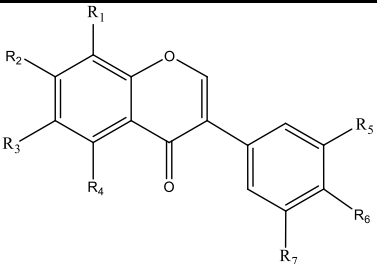
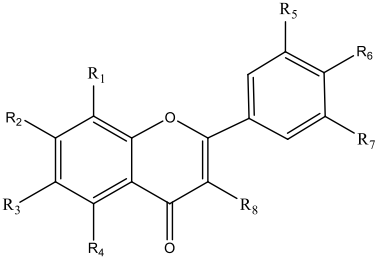
fitoquímicas entre eles são desconhecidas, contudo as diferenças fenotípicas baseiam-se na presença ou ausência de flores ou de tricomas nas pétalas.

Uma pesquisa etnobotânica realizada por Novais¹⁵ (Tabela 1), cujo objetivo foi descobrir os conhecimentos que a população tinha sobre plantas medicinais na região, revelou que existiam várias plantas que eram usadas como medicinas alternativas, sendo uma delas a carqueja. Na Tabela 1 podem ver-se as diversas aplicações que foram descritas. Contudo, existem poucos artigos na literatura que descrevem as atividades inflamatórias deste arbusto¹⁶⁻¹⁸. Nestes artigos foi descrito o isolamento de 9 compostos flavonoides a partir da carqueja (Tabela 2), os quais já tinham sido previamente isolados noutras plantas e que apresentam uma vasta gama de atividades biológicas. Um dos compostos, a genisteína, frequentemente referenciada na literatura pela sua diversidade de atividades biológicas¹⁹⁻²¹ sendo mesmo usada em algumas aplicações terapêuticas, como por exemplo na Terapia de Reposição Hormonal (TRH) em mulheres pós-menopausa²². A análise química (LC-MS) dos extratos aquosos das flores revelou ainda a existência de vários flavonoides, alguns deles glicosilados (Tabela 3). Um deles, a biocanina A, é um flavonoide cuja atividade anti-inflamatória²³ e antiproliferativa²⁴ tem sido descrita várias vezes na literatura.

Tabela 1: Utilização do arbusto *P. tridentatum* que foram descritos na pesquisa etnobotânica de Novais¹⁵ de modo a descobrir algumas plantas medicinais na região.

Seção usada	Condição	Administração	Benefícios
Flores	Seca	Oral	Tratamento da hipoglicémia, constipações, gota, ácido úrico, anti-hipertensivo, anti-hipercolesterolémico, digestivo, antitussico, circulação sanguínea, hepatoprotetor, analgésico gástrico, anti-inflamatório intestinal, antiespasmódico renal e emagrecimento;
	Seca	Externa	Cicatrizante;
Flores e Folhas	Seca	Oral	Doenças da vesícula, anti-hipertensivo, para a azia;
Partes Aéreas	Seca	Oral	Doenças da vesícula, antiespasmódico intestinal.
	Seca ou Fresca	Oral	Anti-diarreico

Tabela 2: Compostos isolados dos extratos aquosos das flores previamente descritos na literatura.

Estrutura	Substituintes	Nome	Algumas Atividades Biológicas Descritas (Referência)
	$R_1, R_3, R_6 = H$ $R_2 = O-Glu$ $R_4, R_7 = OH$ $R_5 = O-Me$	5,5'-Di-hidroxi-3'-metoxi-isoflavona-7-O- β -glicosídeo	*
	$R_1, R_3, R_7 = H$ $R_2 = O-Me$ $R_4, R_5, R_6 = OH$	7-Metilorobol	*
	$R_1, R_3, R_5, R_7 = H$ $R_2, R_4, R_6 = OH$	Genisteína	Anti-angiogénico ²⁵ , hepatoprotector ^{26,27} ,
	$R_1, R_3, R_5, R_7 = H$ $R_4, R_6 = OH$ $R_2 = O-Glu$	Genistina	cardioprotetor ²⁸⁻³⁰ , outras atividades ³¹⁻³³
	$R_1, R_3, R_5, R_7 = H$ $R_4, R_6 = OH$ $R_2 = O-Me$	Prunetina	Anti-obesidade ³⁴ , inibidor da testosterona 5 α -reductase ³⁵ , inibidor da PDE4 ³⁶ , outras atividades ³⁷⁻³⁹
	$R_1, R_3, R_5, R_7 = H$ $R_2 = O-Glu$ $R_4 = OH$ $R_6 = O-Me$	Sissotrina	*
	$R_1, R_5 = H$ $R_2, R_4, R_6, R_7, R_8 = OH$ $R_3 = Glu$	Miricetina-6-C-glucosídeo	*
	$R_1, R_3, R_5 = H$ $R_2, R_4, R_6, R_7 = OH$ $R_8 = O-RhaGlu$	Rutina	Anti-inflamatório ⁴⁰⁻⁴² , anti-trombótico ^{43,44} , anti-diabético ^{45,46} , outras atividades ⁴⁷⁻⁴⁹
	$R_1, R_3, R_7 = H$ $R_2, R_4, R_5, R_6 = OH$ $R_8 = O-Glu$	Isoquercitrina	Antioxidant ⁵⁰ , Tratamento de asma ⁵¹ , outras atividades ⁵²⁻⁵⁴

* Sem atividades biológicas descritas na literatura; todos os compostos foram extraídos do extrato aquoso das flores.

Tabela 3: Compostos putativamente identificados nos extratos aquosos das flores, folhas e do caule do arbusto *Pterospartum tridentatum* usando técnicas cromatográficas (LC-MS).

Compostos identificados nos extratos aquosos	
Composto Identificado	Seção da Planta
Di-hidroquercetina-6-<i>C</i>-hexosídeo Miricetina-6-<i>C</i>-hexosídeo Quercetina dioxi-hexosil-hexosídeo Quercetina-3-<i>O</i>-rutinosídeo Isoquercitrina Quercetina-<i>O</i>-hexosídeo Genistina 5,5'-Di-hidroxi-3'-methoxi-isoflavona-7-<i>O</i>-β-glicosídeo Genisteína-8-<i>C</i>-glucosídeo Metilbiocanina A/Metilprunetina <i>O</i>-hexosídeo Genisteína Derivado de Metilbiocanina A/Metilprunetina Biocanina A <i>O</i>-hexosídeo-<i>O</i>-hexosídeo Sissotrina Biocanina A <i>O</i>-acetil-hexosídeo-<i>O</i>-hexosídeo Biocanina A <i>O</i>-hexosídeo Biocanina A Prunetina 7-<i>O</i>-Metilorobol Metilbiocanina A/Metilprunetina	Flores ⁵⁵
Puerarina Daidzeína Genistina	Folhas e do Caule ⁵⁶

Os flavonoides e isoflavonoides apresentam uma diversidade de atividades biológica resultante da presença de diferentes grupos substituintes na sua estrutura química base. As características mais comuns nestes compostos são hidroxilações, metilações e a presença de glicosídeos, que fornecem aspetos essenciais para a atividade biológica do flavonoide/isoflavonoide. A hidroxilação é a substituição mais comum nas estruturas de aglicona. Esta substituição tem implicações importantes em certas atividades biológicas como, por exemplo, na atividade antiviral para o vírus H5N1⁵⁷. A aplicação de 5,7-di-hidroxisflavonoides a células infetadas pelo vírus inibiu a replicação do mesmo nas células

infetadas. Outro fator influenciadora é a quantidade de grupos hidroxilos presentes: quanto maior o número de substituições menor é a hidrofobicidade⁵⁸ e maior é a sua atividade antioxidante. A glicosilação, tal como a hidroxilação, aumenta a variedade de compostos presentes nas plantas medicinais. A presença de açúcares na estrutura dos flavonoides varia não só com o tipo de açúcar (glucose, galactose, ramnose, etc) mas também com a sua posição na estrutura do flavonoide. Por exemplo, açúcares nas posições 3-OH e C-8, como acontece na rutina e puerarina, conferem-lhe uma maior atividade antiviral do que flavonoides sem glicosilações como a daidzeína⁵⁹. A metoxilação é também um fator influenciador da capacidade biológica que os flavonoides apresentam, visto que esta influencia a fluidez membranar⁶⁰ diminuindo a passagem de certas bactérias e vírus. Esta substituição também influencia a atividade proliferativa, uma vez que compostos 3'-metoxilados apresentam maior poder inibitório (ex. diferença entre os compostos nobiletina e tangeretina)⁶¹. Todos estes fatores garantem uma diversidade de compostos que podem estar presentes nas plantas medicinais, explicando a sua utilização na medicina tradicional.

Os compostos já identificados na *P. tridentatum* apresentam algumas destas substituições e têm sido descritos como tendo atividade biológica relevantes. A genisteína, por exemplo, reduz vários mediadores inflamatórios tendo sido descrito como um forte anti-inflamatório^{27,62} e tem atividade neuroprotetora^{63,64}. Por sua vez a prunetina tem sido descrita como um forte anti-inflamatório, reduzindo a produção de óxido nítrico e inibindo a expressão de mediadores inflamatórios³⁸, tais como PGE₂ e COX-2. Tal como se pode ver da Tabela 2, dos poucos compostos que foram isolados de *P. tridentatum* alguns apresentam imensas atividades biológicas, no entanto a informação na literatura sobre as atividades biológicas da planta é escassa. Dado ser uma planta cujos extratos são amplamente usados na medicina tradicional, tornam-se prementes estudos mais aprofundados acerca do potencial farmacológico deste arbusto.

2.1 Atividade anti-inflamatória

A obtenção de extratos de determinada planta tem geralmente por objetivo efetuar estudos de avaliação de possíveis atividades biológicas e assim sustentar cientificamente a sua

utilização empírica na medicina tradicional. Dada a utilização desta planta para o tratamento de sintomas inflamatórios é crucial o estudo da sua atividade inflamatória. Um dos ensaios mais frequentemente realizado é o de pesquisa da atividade anti-inflamatória. O processo inflamatório é, na sua essência, um mecanismo de defesa que visa eliminar potenciais causas de dano para o organismo⁶⁵, protegendo-o contra infecções e células danificadas ou alteradas que possam ser uma ameaça. No entanto, quando prolongada no tempo ou muito exacerbada, a inflamação acaba por ter efeitos deletérios danificando tecidos normais. A pesquisa de novos medicamentos que possam ajudar a aliviar os sintomas da inflamação ou simplesmente inibi-la é uma grande premência para a medicina atual. Existem inúmeras plantas cuja utilização na medicina tradicional assenta precisamente nas suas propriedades anti-inflamatórias.

A nível molecular, o processo inflamatório é desencadeado pela interação de um padrão molecular associado a um agente patogénico (PAMP) com um recetor de reconhecimento de padrões (PRR)⁶⁶ presente na superfície das células do sistema imunitário. Estes recetores, dos quais se destacam os TLRs, traduzem de seguida o sinal de perigo através de uma complexa cascata de sinalização intracelular que culmina com a ativação de fatores de transcrição tais como o NF- κ B, c-JUN, IRFs e STAT. O fator de transcrição NF- κ B é um elemento central no processo inflamatório e na imunidade inata. Ele encontra-se no citoplasma ligado à proteína I κ B α ⁶⁷, que inativa a sua translocação para o núcleo. Quando a I κ B cinase é ativada, fosforila a I κ B α levando a sua ubiquitinação e posterior degradação pelo proteossoma. O NF- κ B fica então livre e sofre translocação para o núcleo da célula^{67,68} onde vai ativar a transcrição de inúmeros mediadores inflamatórios tais como IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , iNOS e COX-2, entre outros. O NF- κ B é composto por duas subunidades⁶⁹, a p50 (NF- κ B B1) e a p65 (RelA), mas também poderá ter duas outras proteínas pertencentes à família proteica Rel, p52, RelB e cRel. A inflamação passa ainda pela ativação de vias intracelulares como a PI3K/Akt⁷⁰, as MAPKs^{71,72} e a IRF3⁷⁰.

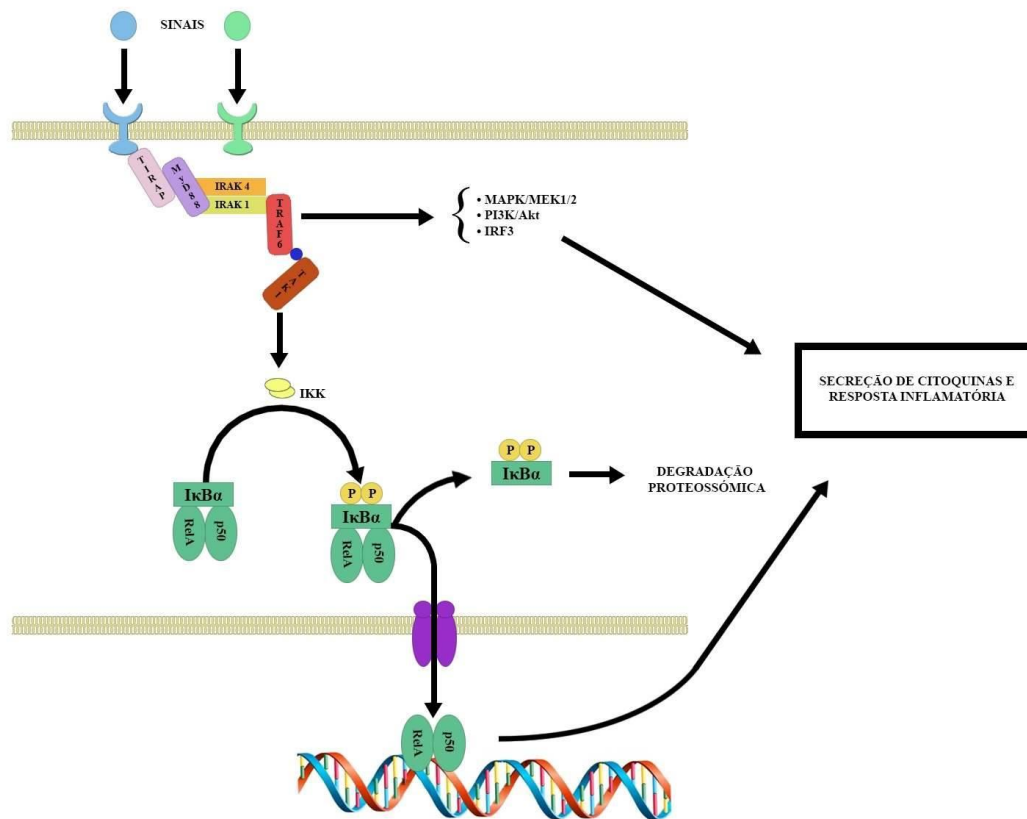


Figura 1: Esquema de um dos mecanismos do processo inflamatório. As moléculas adaptadoras TIRAP e MyD88¹ traduzem o sinal recebido pelo TLR², após o reconhecimento de um agente patogénico, iniciando a cascata de eventos que leva à ativação do NF-κB e da sua translocação para o núcleo. Por outro lado, a TRAF6 leva à ativação das MAPKs, ativando a Erk1/2, a JNK ou a p38, que ultimamente levam à translocação da AP-1 para o núcleo, um fator de transcrição que controla a diferenciação, proliferação e apoptose celular.

O processo inflamatório é uma cadeia complexa de eventos, e a avaliação biológica dos extratos de plantas ou seus constituintes passa por um conjunto de ensaios *in vitro* e/ou *in vivo* que visam averiguar elementos chave desse processo. As técnicas *in vivo* mais utilizadas recorrem ao uso de ratos albinos *Wistar*, enquanto que nos ensaios *in vitro* são usadas linhas celulares de monócitos/macrófagos⁷³, como por exemplo as RAW264.7, THP-1, J774.2, entre

outras. Grande parte dos estudos, fundamentalmente a nível de *screening*, são efetuados usando linhas celulares. Uma das linhas celulares mais usadas para uma análise preliminar de atividade anti-inflamatória é a linha celular de macrófagos RAW264.7. A RAW264.7 permite uma avaliação das vias suprimidas ou estimuladas pelo extrato, permitindo o estudo a nível molecular do mecanismo de ação dos componentes da planta. O ensaio consiste em expor as células a uma concentração não citotóxica de extrato seguindo-se a estimulação das mesmas com agentes inflamatórios, como por exemplo citoquinas ou lipopolissacarídeos bacterianos (LPS). São de seguida avaliados parâmetros ligados ao processo inflamatório tais como a ativação de fatores de transcrição, a expressão de enzimas, e a produção e libertação de citoquinas e mediadores inflamatórios (prostaglandinas, leucotrienos e óxido nítrico (NO)). Entre os parâmetros de maior utilidade na avaliação de atividade anti-inflamatória em ensaios *in vitro* encontram-se a expressão das enzimas iNOS e ciclo-oxigenase (COX-2). A iNOS não é expressa constitutivamente nos macrófagos, sendo apenas fortemente induzida após estimulação, por exemplo, por agentes patogénicos ou seus componentes. A iNOS é responsável pela produção de óxido nítrico (NO)⁷⁴ na ordem dos μM , através da oxidação da L-arginina. O NO difunde-se rapidamente criando um ambiente citotóxico que promove a destruição dos microrganismos invasores⁴⁴, sendo um dos mais efetivos meios de defesa contra infeções. A COX-2 é, tal como a iNOS, uma proteína responsável pela formação de mediadores pro-inflamatórios. A COX-2 converte o ácido araquidónico (AA) em prostaglandina H₂ através da oxidação do AA e da adição de duas moléculas de oxigénio ao sítio oxidado, cuja redução pela peroxidase da COX-2 transforma a prostaglandina G₂ em prostaglandina H₂ (PGH₂)⁴⁹. A PGH₂ pode ser modificada de várias formas, dependendo do tecido em que é produzida. A conversão da PGH₂^{49,50} pode ocorrer pela tromboxano-A sintase para formar tromboxano A₂ (TXA₂), pela prostaciclina sintase para formar prostaciclina (PGI₂), pela prostaglandina D₂ (PGD) sintase para formar PGD₂ ou pela prostaglandina E (PGE) sintase para formar PGE₂. O tromboxano A₂, que está presente nas plaquetas sanguíneas, onde a PGH₂ é convertida a TXA₂, causa a agregação das plaquetas sanguíneas ao aumentar a concentração de cálcio no citoplasma que causa a fusão das mesmas. O TXA₂ tem um efeito oposto da PGI₂, que é produzido pelas paredes dos vasos sanguíneos, e serve como vasodilator e indutor de proliferação das células do músculo liso⁵¹. A PGD₂ que é produzida pelos mastócitos e

macrófagos é um potente vasoconstritor, agente pirogénico e potenciador do processo inflamatório⁵².

Tal como foi referido anteriormente, existe pouca informação na literatura a sustentar as atividades biológicas atribuídas ao arbusto *Pterospartum tridentatum*. Pelo nosso conhecimento não existe nenhum estudo a avaliar diretamente a atividade anti-inflamatória deste arbusto, embora os seus usos sejam principalmente para o alívio de sintomas de inflamação. Dos estudos fitoquímicos realizados, provou-se que existem alguns compostos que possam explicar o uso desta planta para aliviar sintomas de inflamação, tal como a genistina, genisteína, prunetina e a rutina. Todos estes compostos previnem a translocação do NF-Kb para o núcleo ao interferir com o complexo IKK, e suprimem a ativação da p38 e JNK, diminuindo a produção de vários mediadores inflamatórios (Tabela 2). Contudo, estes são só 4 dos 9 compostos já isolados dos extratos aquosos das flores do *P. tridentatum*, o que significa que outros compostos possam possuir características anti-inflamatórias ainda por referenciar. Embora a parte mais consumida da planta sejam as folhas e as flores sob a forma de infusão, ainda não existem estudos que avaliem as características químicas da raiz, do caule ou das folhas como seções individuais.

2.2 Atividade anti-acetilcolinesterase

As doenças neurodegenerativas são um vasto grupo de doenças que progressivamente afetam a estrutura e função dos neurónios. Este leque de doenças afeta maioritariamente a população idosa e normalmente estão associados a alterações citológicas e genéticas que levam à alteração da massa cinzenta do SNC, progressiva perda de neurónios e aumento de agregados proteicos. A doença neurodegenerativa que mais afeta a população idosa é a doença de Alzheimer (DA). Esta doença leva à sucessiva perda das funções cognitivas e alterações no comportamento⁷⁵, levando ultimamente à completa incapacidade do paciente. As causas da DA têm uma natureza complexa, dependente de vários fatores ambientais e genéticos. Existem várias hipóteses competitivas que tentam explicar o mecanismo da doença de forma a encontrar a causa principal que despoleta todo o processo característico da mesma. Uma das causas que tem sido evocada para explicar a DA são as anomalias que ocorrem na enzima colinesterase⁷⁶

(Figura 4). Existem dois tipos de colinesterases, a acetilcolinesterase e a butirilcolinesterase. A acetilcolinesterase (AChE) é uma esterase libertada na fenda sináptica, que termina a transmissão do sinal ao clivar a acetilcolina em colina e ácido acético. A colina é reabsorvida pelo neurónio e usada para formar uma nova molécula de acetilcolina com a ajuda da enzima colina acetiltransferase e de acetil-CoA⁷⁷. A inibição reversível ou irreversível da AChE, em pacientes com DA, leva ao aumento da concentração de sAPP e proteína cinase C (PKC), favorecendo a passagem não amiloidogénica pela estimulação da atividade da α -secretase mediada pela PKC. A forma como a AChE interage com as placas senis tem sido recentemente descrita. A ACh, presente no núcleo das placas senis, forma complexos A β /ACh que aumentam a neurotoxicidade amiloide. A ACh glicosilada associada ao núcleo amiloide das placas senis é estimulada na sua síntese pela amiloide- β ^{78,79}, levando à acumulação dentro ou perto da placa e aumentando o depósito de APP nos neurónios. Assim, intervenções farmacológicas que possam prevenir a interação com a AChE poderão retardar a progressão da DA (Figura 4). A enzima butirilcolinesterase tem funções similares à AChE, contudo encontra-se no plasma sanguíneo e é sintetizada pelo fígado. A sua função é hidrolisar diferentes tipos de ésteres com colina, nomeadamente succinilcolina e fármacos analgésicos/antipiréticos (ex. ácido acetilsalicílico). Pacientes com deficiência ou excesso de BChE (hipo- ou hipercolinesterasemia) podem estar vulneráveis a paralisia neuromuscular prolongada⁸⁰. Outro papel da BChE é a sua capacidade de substituir a AChE após esta ter sido inibida, ampliando o efeito de certos medicamentos no tratamento da DA. Assim, pacientes com DA que tenham níveis baixos de BChE podem não tolerar os inibidores de AChE⁸¹ sendo necessário o estudo do efeito que certos fármacos têm em ambas estas enzimas.

Esta doença apresenta várias características, nomeadamente, a presença de placas amiloides e emaranhados neurofibrilares, compostos maioritariamente de peptídeos A β e proteína tau hiperfosforilada, respetivamente. Estes levam à progressiva perda da função sináptica e neuronal, acompanhada de sérios danos no citoesqueleto axonal e dendrítico, levando à falha e interrupção no transporte de neurotransmissores. A perda de neurónios ocorre em certas regiões subcorticais⁸², levando à atrofia cortical e degeneração nos lóbulos temporal e parietal e, partes do córtex frontal e límbico.

As placas amiloides são depósitos densos e insolúveis do peptídeo β -amiloide e materiais celulares que se acumulam no espaço extracelular á volta dos neurónios. Estas placas são feitas de peptídeos de 39-43 aminoácidos, chamados de β -amiloide ($A\beta$)⁸³. Este é, por sua vez, um fragmento proteico da chamada proteína precursora da amiloide (APP), uma proteína transmembranar essencial para o crescimento neuronal⁸⁴, sobrevivência neuronal e reparação de danos neuríticos. A degradação proteolítica da APP por parte das enzimas β - e γ -secretase leva à formação e agregação de fibras amiloides insolúveis produzindo formações densas conhecidas como placas senis⁸⁵. Outros possíveis efeitos dos agregados $A\beta$ são a interferência no transporte de fragmentos sAPP α neuroprotetores para fora da célula. Consequentemente, a retenção destas proteínas afeta o tráfico de APP cuja caracterização dos efeitos induzidos pelo $A\beta$ no transporte vesicular de APP/sAPP poderá indicar alterações dinâmicas no citoesqueleto. Os emaranhados neurofibrilares, por seu lado, são agregados de proteína tau hiperfosforilada associada a microtúbulos (MAPT), que se acumulam no interior dos neurónios. A hiperfosforilação desta proteína leva à diminuição da sua afinidade à tubulina⁸⁶, emparelhando-se com outras proteínas hiperfosforiladas (proteína tau, MAP2, entre outros), produzindo filamentos helicoidais que desintegram o sistema de transporte neuronal.

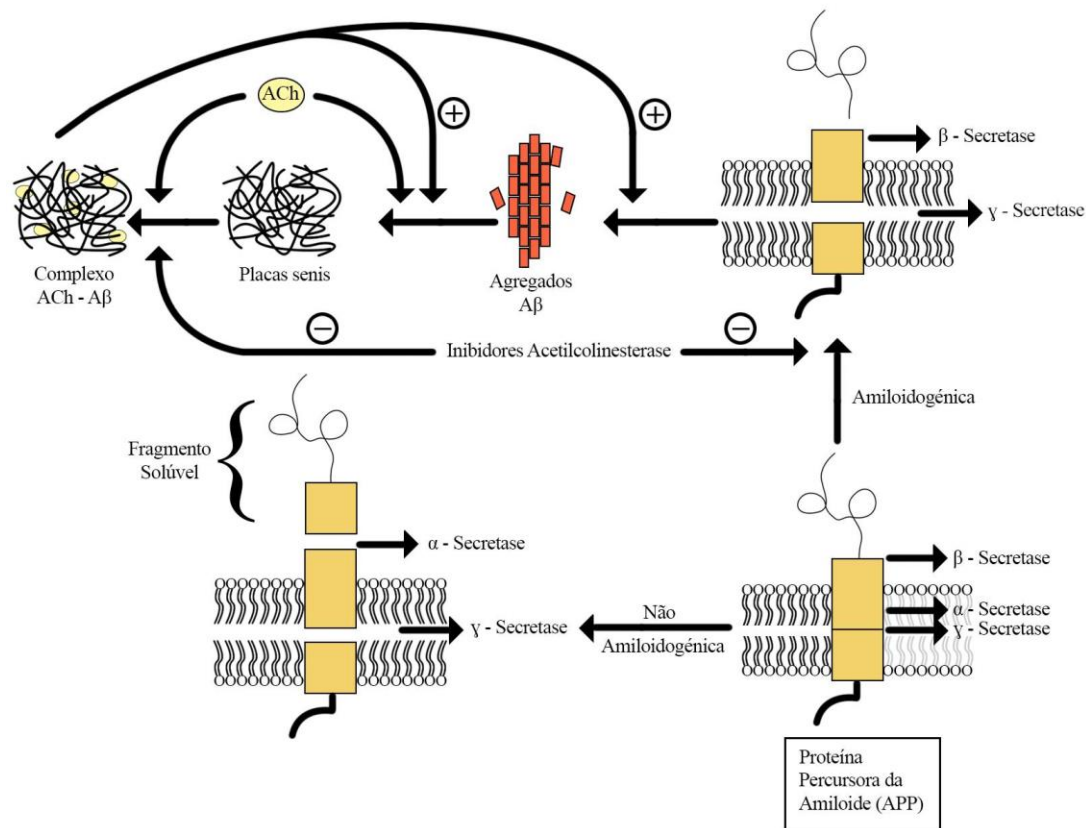


Figura 2: Processo amiloidogénico e não amiloidogénico. A enzima β -secretase cria um fragmento insolúvel que se complexa entre si para formar placas senis no meio extracelular. Estes formam complexos com a acetilcolina que aumenta a formação de agregados $A\beta^{74,75}$, criando um sistema de feedback positivo.

Alguns extratos ou compostos naturais têm provado ser bons inibidores da acetilcolinesterase. Como por exemplo, a quercetina e a mucluraxantona apresentam uma atividade inibitória dependente da concentração⁸⁷. No caso da *P. tridentatum* não existem quaisquer estudos a avaliar atividades biológicas relacionadas com doenças neurológicas ou atividades calmantes. Sabe-se que na família Fabaceae^{88,89}, na qual esta planta se encontra agrupada, existem várias plantas com alcaloides e flavonoides com propriedades antidegenerativas, nomeadamente, que previnem certos sintomas característicos da doença de Alzheimer. Dada a falta de conhecimento sobre as propriedades e os compostos que constituem

as diferentes secções da *P. tridentatum*, a avaliação das propriedades calmantes ou neuroprotetoras revela-se um campo bastante promissor. Embora existam alguns estudos que tentem isolar compostos dos extratos aquosos das folhas nesta planta, há uma ausência de informação sobre o porquê desta planta ser usada como um chá anti-inflamatório.

3. Objetivos:

O objetivo do presente trabalho passou pelo estudo da composição química da planta *P. tridentatum*, assim como pela avaliação *in vitro* e *in chemico* da atividade anti-inflamatório e atividade anti-acetilcolinesteras, respetivamente, dos extratos etanólicos da raiz, do caule e da folha. Foram também isolados compostos do extrato da raiz com o objetivo de investigar esta secção da planta nunca previamente estudada. Este trabalho constituiu, de acordo com o nosso conhecimento, a primeira análise das secções individuais da planta – raiz, caule e folhas - e da respetiva atividade anti-inflamatória e anti-colinesterase.

4. Material e métodos

4.1 Material vegetal e preparação dos extratos

A planta *Pterospartum tridentatum* foi recolhida em populações selvagens na área da Serra da Estrela (Centro de Portugal) no fim da sua época de floração (Agosto, 2015). O material vegetal foi identificado pela Doutora Rosa Pinho e outros colaboradores do Departamento de Biologia e do Herbário da Universidade de Aveiro como sendo *Pterospartum tridentatum* subsp. *lasiantum*. Após a recolha total da planta (desenterrada do solo), esta foi deixada a secar durante 1 mês sendo posteriormente dissecada para obter as três secções – raiz, caule e folhas. A distinção entre o caule e as folhas foi feita com base no seguinte princípio: as secções consideradas folhas são as áreas do arbusto que realizam fotossíntese, e como tal as partes como o caule com asas realizam fotossíntese, logo foi tratado como “nervura” e considerada como parte das folhas. Feita a separação dos órgãos, cada seção – raiz, caule e folhas - foi triturada usando o moinho Retsch SKI com martelos cruzados equipados com peneira de 1 mm (40-mesh).

4.2 Análise por Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massa

Os solventes usados (hexano, diclorometano, acetona, acetato de etilo e metanol) para obter as diferentes frações por cromatografia em camada fina (TLC) e na separação em placas de sílica preparativa (20x20) foram bidestilados. Os solventes usados para obter os espectros de RMN foram clorofórmio deuterado (CDCl_3) e acetona deuterada. As experiências usando RMN (^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, DEPT 90, HSQC e HMBC) foram realizadas usando os espectrómetros Bruker Avance 300 e Avance 500 ou Avance 700 (300,13, 500,13 e 700,13 MHz para ^1H , 75,47, 125,77 e 700,13 MHz para ^{13}C) usando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os desvios químicos (δ) são expressos em ppm (partes por milhão) e as constantes de acoplamentos (J) estão em Hz (Hertz). As experiências usando espectrometria de massa foram realizadas com o espectrómetro Micromass Q-TOF2 com ionização por electrospray em modo positivo (ESI^+), operando com um cone de 30 V. As cromatografias preparativas foram realizadas em placas de vidro (20x20 cm) cobertos por uma camada fina de sílica gel (Merck sílica gel 60 F_{254} ativado a 110°C durante 12-14 h) e as bandas foram observadas usando uma lâmpada de UV (λ 254 e 366 nm). A otimização dos eluentes usados para fracionar os extratos foi efetuada em placas preparativas de TLC laminadas com Merck sílica gel 60 GF_{254} . A cromatografia líquida acoplada ao espectrómetro de massa (LC-MS) foi realizada usando o cromatógrafo de ultra-performance Ultimate 3000RSLC Thermo SCIENTIFIC acoplado ao espectrómetro de massa LTQ XL Linear Ion Trap 2D com ionização por electrospray em modo positivo (ESI^+), operando com um cone ortogonal.

4.3 Extração e isolamento

A extração dos compostos foi feita com um aparelho de Soxhlet (Figura 3). Porções de cada secção foram devidamente pesadas (Tabela 4) num cartuxo limpo, tapado com algodão neutro e colocado no aparelho de Soxhlet. Os cartuxos foram limpos e secos entre cada utilização. Após estarem secos, uma nova amostra da outra secção foi inserida no cartuxo e tratada da mesma forma como descrito em cima. Cada amostra foi deixada em refluxo no aparelho de Soxhlet durante 8 h com 3 L, 2 L e 2 L (raiz, caule e folhas, respetivamente) de etanol 99%, findo o qual cada extrato foi devidamente evaporado à secura. Na Tabela 4 estão

resumidas as quantidades de amostra usada para cada secção. Foram realizadas extrações de quatro amostras de cada secção, num total de amostra vegetal de 624.31 g, 533.68 g e 515.86 g de raiz, caule e folhas, respetivamente (Tabela 4). A primeira extração de cada uma das secções sofreu dois ciclos de extração. Isto serviu para avaliar o processo de extração de Soxhlet, tendo por objetivo verificar se existia quantidade mensurável na segunda extração, que implicaria repetir a extração por Soxhlet com a mesma amostra tantas vezes quanto necessárias até que houvesse uma quantidade extraída de %m/m inferior a 5%. Como nesta segunda extração se obtiveram valores de %m/m <2%, a partir daí só foi realizada uma extração para cada amostra. Os extratos resultantes dos dois ciclos da primeira extração de cada secção foram juntas para o mesmo balão e usados para os ensaios biológicos. As restantes três extrações realizadas com amostras diferentes, foram juntas para o mesmo balão e usado para o isolamento dos componentes puros.

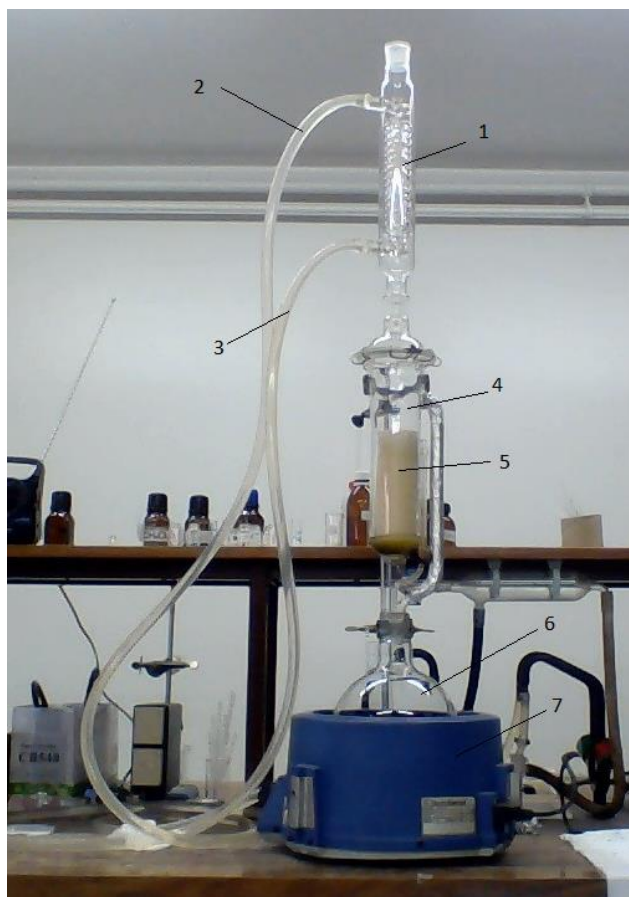


Figura 3: Imagem da montagem de Soxhlet em funcionamento com uma amostra. A legenda da figura é: 1 – condensador; 2 – mangueira com saída de água; 3 – mangueira com entrada de água; 4 – câmara de Soxhlet; 5 – cartuxo com a amostra; 6 – balão de fundo redondo; 7- manta de aquecimento;

Tabela 4: Massa do extrato de raiz, do caule e das folhas obtidas para a análise das atividades biológicas e para o isolamento de compostos, após estarem completamente secos.

Extrato	Extrato p/Atividades Biológicas			Extrato p/Isolamento de Compostos		
	M _{total} de extrato obtido (g)	M _{total} amostra usada (g)	Rendimento da extração (%)	M _{total} de extrato obtido (g)	M _{total} amostra usada (g)	Rendimento da extração (%)
Raiz	26.267	155.873	16.85	83.634	624.309	17.85
Caule	26.834	132.745	20.21	71.856	533.676	17.92
Folhas	29.912	126.499	23.64	116.525	515.856	29.93

O extrato da raiz (R) foi fracionado a frio com cinco solventes de polaridade crescente: hexano (H), diclorometano (D), acetato de etilo (AE), acetona (A) e metanol (M). Cada eluente foi deixado a fracionar durante 3 h, onde após terminar este tempo, o solvente foi filtrado para um balão pesado e etiquetado. O resto do extrato que não ficou dissolvido foi deixado a agitar numa nova quantidade de solvente, repetindo o processo descrito até completar um ciclo de fracionamento de 24 h. Após as 24 h, o extrato foi seco e posto a agitar da mesma forma com o próximo solvente de polaridade crescente. Cada fração foi evaporada à secura usando um evaporador rotativo obtendo as quantidades mencionadas na Figura 4.

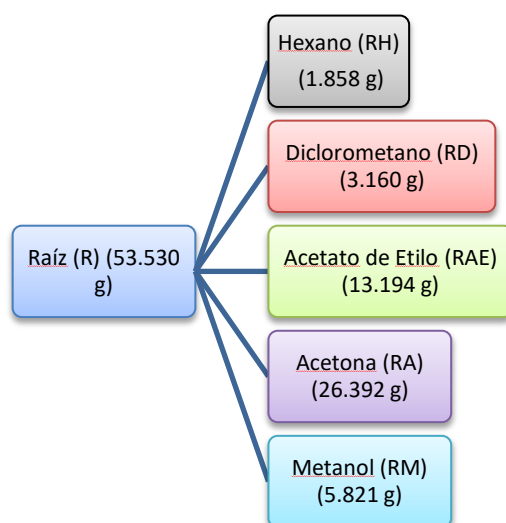


Figura 4: Fluxograma das massas obtidas pelo fracionamento do extrato da raiz (R).

A fração de hexano da raiz (RH, 1858 mg) foi separada por cromatografia em coluna de sílica gel e eluída com um sistema gradiente de polaridade crescente diclorometano:acetona (0-100%). Desta coluna, recolheram-se 32 frações que foram combinadas baseadas no perfil do TLC criando as frações principais RH1-RH5. As frações obtidas de 1 a 6 foram unidas para formar a fração RH1 (464 mg). Este, originou um precipitado branco que foi previamente filtrado num funil de prego, usando acetona como solvente, dando a fração pre-RH1 (30 mg). A restante fração foi separada em placas de sílica com o eluente hexano:acetona 3:1 para dar as frações RH1.1 a RH1.4. A fração RH1.4 (292 mg) foi purificada em placas de sílica com o

eluente hexano:acetona 3:1 eluída duas vezes para dar as frações RH1.4.1 a RH1.4.8. A fração RH2 (645 mg) foi separada em placas de sílica com o eluente hexano:acetona 3:1 para dar as frações RH2.1 (4 mg) e RH2.2 (5 mg). A fração RH3 (160 mg) foi separada em placas de sílica com o eluente diclorometano, eluída 3 vezes, para dar as frações RH3.1 a RH3.5. A fração RH3.5 equivale ao **composto 1** (36 mg). A fração RH5 (147 mg) formou um precipitado pouco solúvel em solventes de baixa polaridade. Assim, esta fração foi refracionada com agitação em metanol durante 1 h e depois em água destilada durante 1 h. As restantes frações não foram purificadas devido à falta de tempo. Todas estas informações encontram-se resumidas na Figura 5.

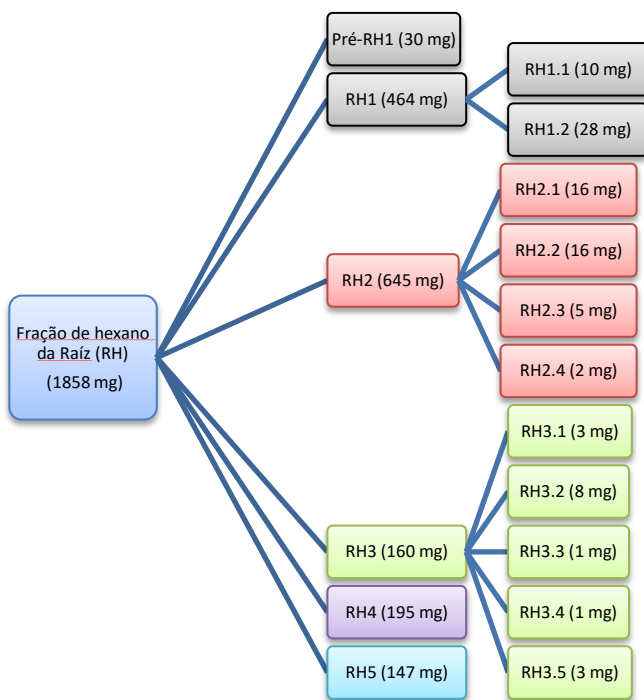


Figura 5: Fluxograma das massas obtidas do fracionamento da fração de hexano da raiz (RH).

A fração de diclorometano da raiz (RD, 3160 mg) foi separada por cromatografia em coluna de sílica gel e eluída com um sistema gradiente de polaridade crescente diclorometano:acetona (0-100%) e terminada com metanol. Desta coluna, recolheram-se 32 frações que foram combinadas baseadas no seu perfil de TLC criando as frações principais

RD1-RD32. Devido á similaridade dos perfis obtidos em placa TLC, as frações RD4 a RD7 foram juntas para formar a fração RD4-7 (72 mg), tal como as frações RD9 e RD10 foram juntas para formar as frações RD9-10 (52 mg). A fração RD1 (236 mg) foi fracionada em placas de sílica com o eluente hexano:acetona 5:1 para dar as frações de RD1.1 (27 mg), RD1.2 (109 mg) e RD1.3 (32 mg). A fração RD1 também formou um precipitado branco que foi previamente filtrado num funil de prego, usando acetona como solvente, dando a fração pre-RD1 (7.1 mg). A fração RD1.2 foi purificada por placas de sílica com o eluente hexano:acetona 4:1, eluída 3 vezes, para dar as frações de RD1.2.1 a RD1.2.10. A fração RD1.2.3 equivale ao **composto 2** e a fração RD1.2.4 equivale ao **composto 3**. A fração RD4-7 foi fracionada em placas de sílica com o eluente hexano:acetona 3:1, eluída 3 vezes, para dar as frações de RD4-7.1 a RD4-7.7. A fração RD4-7.4 foi fracionada em placas de sílica com o eluente hexano:acetona 3:2 para obter as frações RD4-7.4.1 a RD4-7.4.4. As restantes frações não foram purificadas devido à falta de tempo. Todas estas informações encontram-se resumidas na Figura 6.

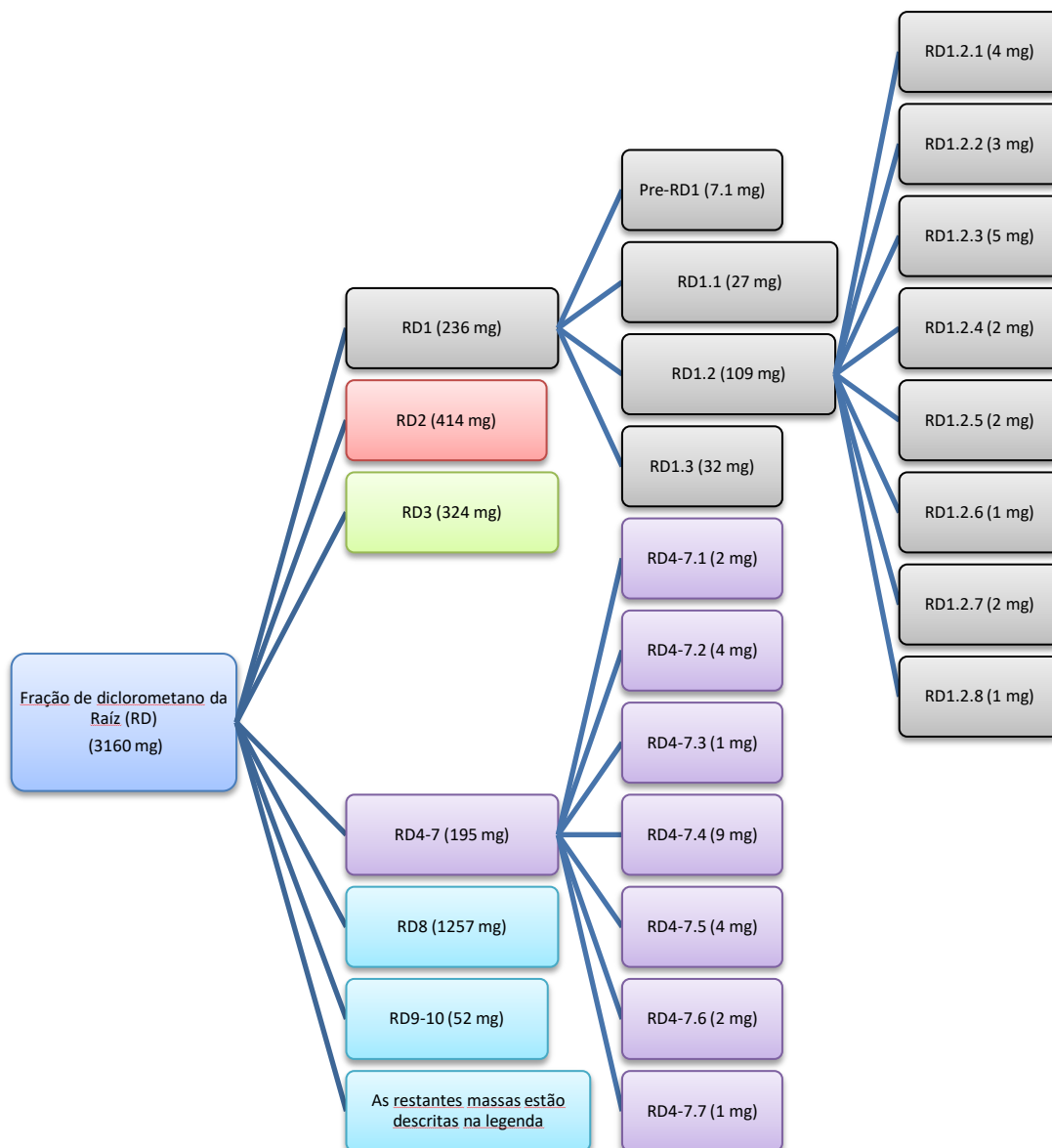


Figura 6: Fluxograma das massas obtidas do fracionamento da fração de diclorometano da raiz (RH). As restantes massas são RD11 (219 mg), RD12 (34 mg), RD13 (48 mg), RD14 (68 mg), RD15 (23 mg), RD16 (4 mg), RD17 (5 mg), RD18 (126 mg), RD19 (26 mg), RD20 (13 mg), RD21 (11 mg), RD22 (1 mg), RD23 (147 mg), RD24 (54 mg), RD25 (44 mg), RD26 (75 mg), RD27 (22 mg), RD28 (18 mg), RD29 (31 mg), RD30 (9 mg), RD31 (12 mg) e RD32 (5 mg).

4.4 Análise dos Extratos usando UHPLC-MS-ESI/MSⁿ

Os sistema de UHPLC consiste num tubo de 20 μ L, uma bomba Dionex Ultimated 3000 RS LC e um detetor Dionex Ultimated 3000 RS DAD (Thermo Fischer Scientific, San Jose, CA, USA). A separação dos compostos foi realizada com um programa de eluição em gradiente a uma taxa de fluxo de 0,2 mL/min, a 30°C, usando a Hypersil Gold (coluna de 1,9 μ m fornecida por Thermo Fischer (Thermo Fischer Scientific, San Jose, CA, USA)). O volume injetado no sistema UHPLC foi de 2 μ L e a fase móvel consiste em água acidificada com 0,1% ácido fórmico (A) e acetonitrilo (B). A separação ocorreu num tempo total de 34,7 min e aos tempos de retenção 0, 14,7, 16,6, 18,8, 24,0 e 34,0 foram alteradas as percentagens de A e B sendo que as 5,0, 40,0, 100,0, 100,0, 5,0 e 5,0% foram as percentagens de B. A deteção online foi realizada com um detetor de matriz de díodos (DAD) a 220, 230, 240 e 280 nm. O espectro de UV tem um intervalo de 190-450 nm, tal como registados. Antes da injeção, cada extrato foi dissolvido em metanol de grau HPLC, para obter uma concentração final de extrato de 5 mg/mL, que depois foi filtrada por uma seringa com filtro de 0,2 μ m. Na análise ESI-MSⁿ, o HPLC foi acoplado ao espectrómetro de massa LTQ XL Linear Ion Trap 2D (ThermoFisher SCIENTIFIC, San Jose, CA, USA), equipada com uma ionização em *electrospray* ortogonal operando em modo negativo (-10V). A voltagem do spray foi de 5 kV e a temperatura capilar foi de 275°C. A aquisição dos dados foi feita usando o sistema de dados Xcalibur® (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA).

4.5 Cultura de células

A linha celular de macrófagos de murganho RAW 264.7 (número ATCC: YIB-71) foi cultivada em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino não activado-, penicilina 100 U/mL, e estreptomicina, e incubada a 37°C numa atmosfera húmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂.

4.6 Ensaios de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada usando o ensaio de resazurina. Neste ensaio, 5×10^4 células/poço numa placa de 96 poços foram expostas a diferentes concentrações de extrato (500 µg/mL, 250 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL e 10 µg/mL), durante 24 h. Uma hora antes de terminar a exposição, o meio celular foi mudado para um meio igual ao anterior contendo a solução de resazurina para uma concentração final de 50 µM. A absorvência foi lida aos 570 e 600 nm num espectrofotômetro MultiSkan Go (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

4.7 Avaliação da produção de óxido nítrico

A concentração de nitrito no sobrenadante da cultura celular foi avaliada por reação colorimétrica com o reagente de Griess. As células foram plaqueadas como acima descrito e tratadas com varias concentrações de extratos das diferentes secções da planta. 1 hora mais tarde foi adicionado 1 µg/mL de LPS. Após 24 h, 100 µL do sobrenadante da cultura foi recolhido tendo-lhe sido adicionado igual volume de reagente de Griess (0,1% [w/v] NED e 1% [w/v] sulfanilamida com 5% [w/v] H_3PO_4). Após 30 min de incubação no escuro á temperatura ambiente, a absorvência das amostras foi registada usando um leitor de microplaca a 550 nm. A concentração de nitritos foi calculada através de uma curva de calibração de nitrito de sódio, servindo o meio de cultura como branco.

4.8 Determinação da atividade *scavenging* de óxido nítrico

A potencial atividade *scavenging* de NO dos extratos foi avaliada usando *S*-nitroso-*N*-acetilpenicilamina (SNAP) como dador de NO. Cada extrato (raiz, caule e folhas) (100 µg/mL) e SNAP (300 µM) foram adicionadas a meio de cultura e mantidas num incubador humidificado a 37°C durante 3 h. O meio foi recolhido e os níveis de nitritos foram determinados pela reação de Griess como acima descrito.

4.9 Análise de Western Blotting

Para avaliar o efeito dos extratos na expressão das proteínas inflamatórias iNOS e COX-2 recorreu-se à técnica de Western Blot. Resumidamente, os macrófagos RAW 264,7 foram plaqueados em placas de 6-poços (2×10^6 células/poço) e deixados estabilizar durante a noite. Posteriormente foram tratados com o extrato etanólico de raiz, caule ou folha do arbusto *Pterospartum tridentatum* (100 µg/mL) ou com LPS (1 µg/mL). As células foram recolhidas e lisadas durante 30 minutos em gelo em tampão RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 0,5% ácido desoxicólico, 0,1% SDS e 2 mM EDTA) suplementado com 1 mM de ditiotretol, inibidores de proteases e inibidores de fosfatases. Após vortex, as amostras foram centrifugadas a 12,000g durante 10 min a 4°C. Por fim recolheu-se os extratos pós-nucleares, os quais foram utilizados como lisados celulares totais. A concentração proteica de cada amostra foi determinada pelo método do ácido bicinonínico. Os lisados foram posteriormente desnaturados com tampão de Laemli (0,125 mM Tris pH 6,8, 2% (w/v) SDS, 100 mM ditriotretol, 10% glicerol e azul de bromofenol) aquecendo durante 5 min a 95°C. Quantidades equivalentes de proteínas foram aplicadas e separadas em gel SDS-PAGE 10% (v/v), sendo posteriormente transferidas para membranas PVDF (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia). As membranas foram inicialmente bloqueadas com leite seco desnatado 5% (m/v) em tampão salino Tris contendo Tween-20 0,1% (v/v) (TBS-T), durante 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente foram incubadas durante a noite a 4°C, com os anticorpos primários de coelho ou murganho para iNOS (1:10,000; R&D Systems, Minneapolis, MN), COX-2 (1:10,000; Abcam, Cambridge, UK). Após lavagem em tampão TBS-T, as membranas foram incubadas à temperatura ambiente durante 1h em anticorpos secundários anti coelho ou anti murganho ligados à fosfatase alcalina. As bandas imunorreativas foram visualizadas usando substrato ECF e o sistema de imagem Thyphoon FLA 9000 (GE Healthcare). Para assegurar o carregamento de igual quantidade de proteína entre condições, removeram-se os anticorpos previamente utilizados e incubaram-se novamente as membranas com anticorpo de murganho antitubulina. Seguiu-se a incubação com anticorpo secundário antimurganho conjugado com fosfatase alcalina e a visualização por quimiofluorescência. As bandas foram quantificadas usando o software *Total Lab 2009* (TotalLab Ltd).

4.10 Avaliação do potencial anti-oxidante *in vitro*

A potencial atividade antioxidante dos extratos a nível celular foi determinada pela sua capacidade de prevenir o stress oxidativo induzido por LPS nos macrófagos. Resumidamente, as células foram plaqueadas a $0,05 \times 10^6$ por poço em câmaras μ Slide (IBIDI GmbH, Alemanha), e deixadas a estabilizar durante a noite. De seguida foram adicionados os extratos ou 5 mM de *N*-acetilcisteína (antioxidante usado como controle positivo) e 1 hora depois 1 μ g/ml de LPS. Após 18h de incubação, as células foram lavadas três vezes com HBSS (em mM: 1,3 CaCl₂, 0,5 MgCl₂, 5,3 KCl, 138 NaCl, 0,44 KH₂PO₄, 4,2 NaHCO₃ e 0,34 Na₂HPO₄, pH 7,4) e depois carregadas com 5 μ M de H₂DCFDA HBSS durante 30 min a 37°C no escuro. As células foram lavadas três vezes com HBSS e analisadas com um microscópio fluorescente Axio Observer Z1 (Zeiss Group, Oberkochen, Alemanha) com uma ampliação de 63X.

4.11 Avaliação da transcrição de genes inflamatórios por qPCR

Os efeitos dos extratos na transcrição dos genes *Il1b*, *Nos2*, *Ptgs2*, *Il6* e *Tnfa* foram avaliadas por PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Após o tratamento das células com os extratos em estudo seguiu-se o isolamento do ARN total com o reagente TRIzol de acordo com as instruções do fabricante. A determinação da concentração de ARN e a averiguação de possíveis contaminantes foi conseguida por monitorização das absorvâncias a 260 e 280 nm com auxílio de um espectrofotómetro *NanoDrop* (ThermoScientific). As amostras foram armazenadas em solução de armazenamento para ARN, RNA-Stop a -80°C até posterior uso. Previamente à análise por qPCR, 1 μ g de ARN foi retrotranscrito por recurso ao *kit* de síntese de cDNA *iScript Select*. Seguidamente efetuaram-se as reações de PCR utilizando a sonda *SYBR Green* e recorrendo ao sistema de deteção *CFX Connect* (Bio-Rad). Após a amplificação recorreu-se ao *software CFX Connect System* de modo a determinar o valor limiar (*threshold*) para cada gene em análise e normalizaram-se os resultados usando o gene *Hprt1* como referência. A comparação final dos rácios de transcrição entre amostras foi calculada pelo método de quantificação relativa corrigido para a eficiência de *primers* específicos. As sequências dos *primers* foram delineados através do *software Beacon Designer v 7.7* (Premier Biosoft International) e exaustivamente testadas.

4.12 Avaliação da atividade anti-acetilcolinesterase

As inibições da AChE pelos extratos da planta foram avaliadas segundo descrito por Hlila⁹⁰. Foram preparadas as seguintes soluções: solução A (0,25 U/mL de AChE em 100 mM de tampão fosfato, pH 7,0, 0,1% BSA), tampão fosfato (100 mM de fosfato de sódio, pH 8,0), solução de DTNB (3 mM de DTNB em 100 mM de tampão fosfato), solução de ATChI (75 mM de ATChI em 100 mM de tampão fosfato) e a mistura do substrato (75 mM de ATChI e 3 mM de DTNB em tampão fosfato). As amostras dos extratos (5 mg/mL) foram preparadas em etanol para reduzir a inibição que o solvente poderá ter nas enzimas durante o ensaio. Foram pipetadas 240 µL do extrato no primeiro poço e aos seguintes poços foram adicionados 120 µL de tampão fosfato. Foram transferidas 120 µL do primeiro poço para o segundo poço, misturando meticulosamente, e transferindo outros 120 µL para o seguinte poço de modo a fazer uma diluição em série. A todos os poços foram adicionados 110 µL de tampão fosfato e 10 µL da solução A para o 2-12º poço. Após incubar a enzima com o extrato durante 5 min, adicionou-se a todos os poços 10 µL da mistura do substrato, contando o primeiro tempo após a primeira adição. Terminado isto colocou-se a placa no leitor programado a agitar 5 s e ler a Abs₄₁₅ aos 0 s, 150 s, 300 s e 450 s. Cada ensaio foi repetido três vezes para cada extrato. O cálculo da atividade enzimática foi calculada segundo a equação apresentada a seguir. A inibição da acetilcolinesterase foi calculada comparando com as taxas da enzima das amostras dos extratos com o branco (mistura sem extrato). O donepezil com uma concentração de 2,9 mM serviu como controlo positivo. A percentagem de inibição foi calculada usando a equação:

$$Inibição (\%) = 1 - \left[\frac{RR_{amostra}}{RR_{controlo}} \right] \times 100$$

Em que $RR_{amostra}$ é a taxa de reação das amostras dos extratos e $RR_{controlo}$ é o do branco.

5. Resultados e discussão

5.1 Isolamento de compostos da raiz

A análise das frações de hexano e diclorometano do extrato de etanol da raiz do *P. tridentatum* levou ao isolamento de um novo flavonoide prenilado (**3**) e dois outros já previamente isolados noutras espécies, cujos dados na literatura concordam com o que está

apresentado, como lupinifolina (**1**) e mundulina (**2**). A caracterização estrutural destes 3 compostos por RMN e espectrometria de massa estão descritos em seguida:

Lupinifolina (**1**) (fração RH3-5)

Os dados espectroscópicos deste composto estão resumidos nas Figuras 7 e 8 e na Tabela 5. A análise dos dados do ESI⁺-TOF do composto **1** revelou a presença de um íon quasi-molecular a m/z 407 (M+H)⁺ com fórmula molecular C₂₅H₂₆O₅. O espectro de RMN de ¹H revelou a presença de um singlete a δ_H 12,23 (1H, s, 5-OH). Este desvio químico é característico da formação de uma ponte de hidrogénio entre um protão do grupo hidroxilo do com o oxigénio de um grupo carbonilo que normalmente está associado a uma estrutura flavonoide. Com este dado, é possível atribuir os picos do RMN de ¹H e de ¹³C na estrutura apresentado na figura 7. A partir do espectro de HMBC, foi possível identificar a partir deste protão, os carbonos C-5, C-6 e C-10 a δ_C 156,6, 108,7 e 102,7, respetivamente. O sinal em forma de duplete a δ_H 3,20 (2H, d, J 7, H-1'') foi atribuído à ressonância de um grupo metilénico cujo carbono surge a δ_C 21,5 (C-1''). As correlações HMBC destes protões permitiram identificar os carbonos C-7, C-2'' e C-3'' a δ_C 159,9, 122,5 e 131,1, sendo o primeiro e o último, dois carbonos não ligados a protões, e o carbono a δ_C 122,5 um carbono terciário, cujo sinal de protão surge na forma de tripleto a δ_H 5,14 (1H, t, J 7,4, H-2''). O desvio químico do carbono C-2'' e dos seus protões é característico de uma dupla ligação. Todos estes dados e as correlações HMBC dos protões a δ_H 1,65 (3H, s, H-4'') e 1,64 (3H, s, H-5'') com os carbonos primários C-5'' e C-6'' confirmam a presença de um grupo prenilo.

A presença de dois dupletos a δ_H 6,87 (2H, d, J 8,5, H-3',5') e 7,31 (2H, d, J 8,5, H-2',6') ligados a carbonos terciários δ_C 115,5 (C-3',5') e 127,7 (C-2',6'), respetivamente, sugerem a existência de um anel aromático *para*-substituído. As correlações HMBC de H-2',6' permitem a identificação de um carbono não protonado a δ_C 156,0 (C-4'), enquanto as de H-3',5' permitem a identificação dos carbonos C-2',6' e C-4', e outro carbono não protonado a δ_C 130,9 (C-1'). A desproteção do carbono C-4' sugere a presença de um átomo muito eletronegativo, o grupo -OH. Outro par de dupletos presentes no espectro de RMN de ¹H a δ_H 6,63 (1H, d, J 10,0, H-4''') e 5,50 (1H, d, J 10,0, H-3''') ligados a dois carbonos terciários δ_C 126,0 (C-3''') e 115,6 (C-4'''), respetivamente, sugerem a presença de uma outra dupla

ligação. As correlações HMBC do próton H-4''' permite a identificação de carbonos não protonados a δ_C 78,1 (C-2''') e 159,9 (C-7). O sinal próton a δ_H 6.63 (1H, d, J 10,0, H-3''') correlaciona-se com o dos carbonos C-2''' e C-6, indicando que esta dupla ligação está ligada ao anel A do flavonoide. As correlações HMBC dos dois singletos a δ_H 1,44 (6H, s, H-5''' e H-6'''), ligados a dois carbonos primários a δ_C 28,30 (C-5''') e 28,39 (C-6'''), permitem a identificação do C-2''', e sugerem que está ligado aos dois carbonos primários e ao carbono 3''', contudo a desproteção deste carbono indica também que está ligado a um átomo bastante eletronegativo. Em resumo, todos estes dados indicam a presença de um anel pirano ligado ao anel A, que deve ser resultar da condensação de uma cadeia prenilo com o grupo 7-hidroxilo do anel A.

Os únicos prótons que permitem identificar, através das correlações HMBC, o carbono carbonílico do anel C são os dois sinais em forma de duplo duplete a δ_H 2,97-3,10 (H-3), que estão ligados ao carbono secundário a δ_C 43,2 (C-3). As referidas correlações também permitem confirmar a ressonância de C-1' e do carbono terciário a δ_C 78,5 (C-2), que se encontra ligado ao próton sob a forma de multiplete a δ_H 5,30-5,37 (H-2). O sistema ABX dos prótons H-2 e H-3 e os espectros DEPT-135 e DEPT-90 confirmam a estrutura de uma flavanona. A maioria das flavanonas naturais apresenta um grupo arilo em C-2 com orientação- α , ou seja apresentam uma configuração absoluta S^{91} . As elevadas constantes de acoplamento entre H2 e H3 no anel heterocíclico indica que a estrutura favorece termodinamicamente a conformação equatorial do grupo C2-arilo⁹² confirmando que este composto apresenta a configuração *S*. Assim, este composto foi corretamente identificado como (*S*)-5-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-8,8-dimetil-10-(3-metilbut-2-enil)-2,3-di-hidropirano[3,2-*g*]cromen-4-ona, comumente conhecido como lupinifolina e confirmado na literatura⁹³.

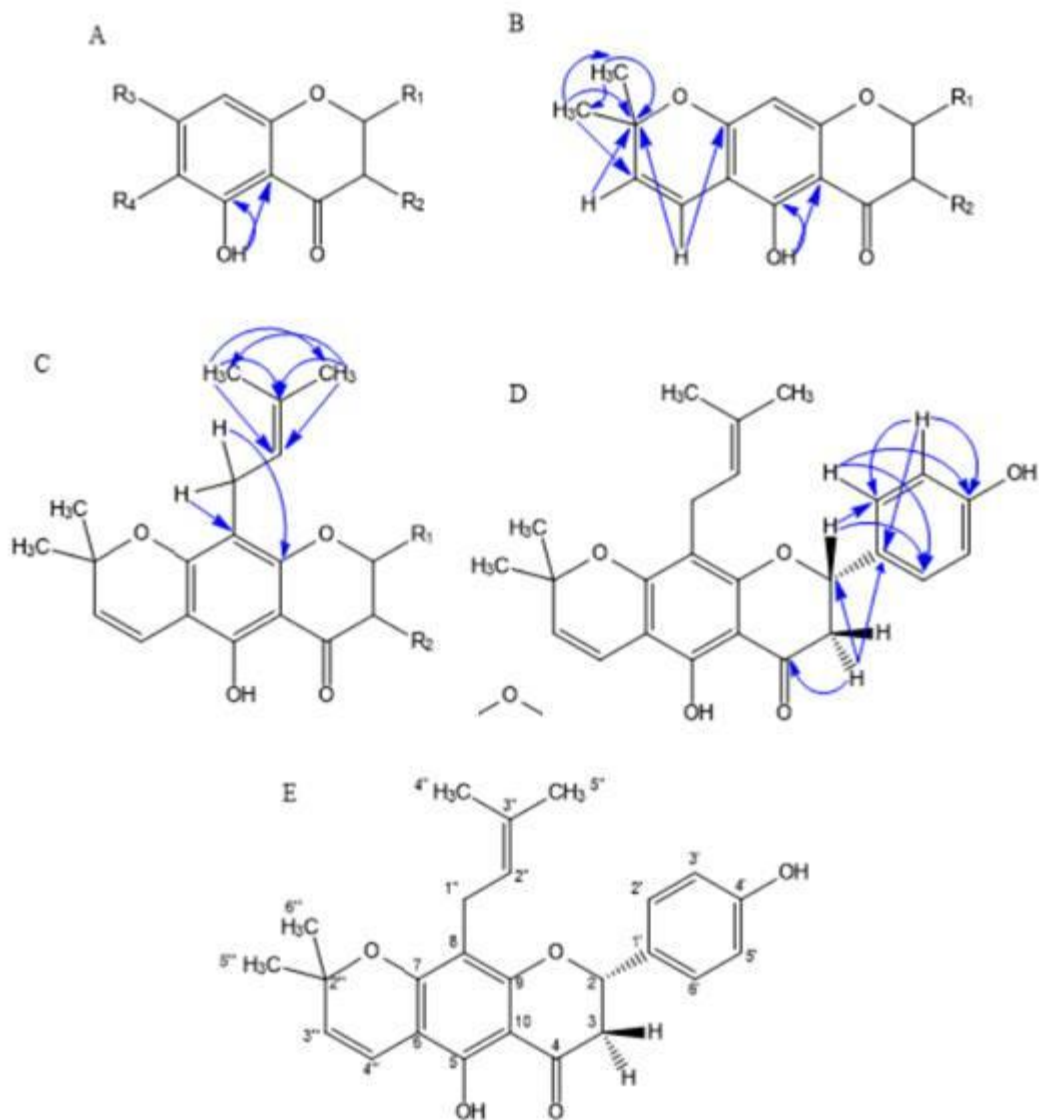


Figura 7: Identificação dos carbonos e prótons na elucidação da estrutura do composto lupinifolina. A – identificação do anel A e C do flavonoide baseado no espectro de HMBC e da ligação de hidrogénio do grupo 5-hidroxilo; B – identificação da unidade pirano da estrutura; C – identificação da cadeia prenilo; D – identificação do anel aromático; E – estrutura da lupinifolina com todos os carbonos numerados.

A lupinifolina é um flavonoide prenilado já previamente isolado⁹⁴, contudo existem poucos estudos a descrever as suas atividades biológicas. Sabe-se que a lupinifolina tem uma importante atividade antibacteriana⁹⁵ e antitumoral⁹⁶, contudo estas são as únicas atividades

biológicas testadas. A avaliação anti-inflamatória deste composto seria um excelente alvo para futuros estudos uma vez que a sua atividade biológica é pouco referida na literatura.

Os dados espectroscópicos da lupinifolina são as seguintes: (*S*)-5-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-8,8-dimetil-10-(3-metilbut-2-enil)-2,3-di-hidropirano[3,2-*g*]cromen-4-ona. Óleo alaranjado; RMN de ^1H (ppm, 300 MHz, CDCl_3): δ 1,44 (6H, s, H-5''' e H-6'''), 1,64 (3H, s, H-5''), 1,65 (3H, s, H-4''), 2,78 (1H, dd, J 17,11, 3,33, H-3eq), 3,04 (1H, dd, J 17,11, 12,80, H-3ax), 3,20 (2H, d, J 7,32, H-1''), 5,14 (1H, t, J 7,32, H-2''), 5,30-5,37 (1H, m, H-2), 5,50 (1H, d, J 9,99, H-3'''), 6,63 (1H, d, J 9,99, H-4'''), 6,87 (12H, d, J 8,52, H-3',5'), 7,31 (2H, d, J 8,52, H-2',6'), 12,23 (1H, s, C5-OH). RMN de ^{13}C (CDCl_3): δ 17,8 (C-5'''), 21,5 (C-1''), 25,8 (C-4'''), 28,3 (C-5'''), 28,4 (C-6'''). 43,2 (C-3), 78,1 (C-2'''), 78,5 (C-2), 102,7 (C-8), 102,7 (C-10), 102,8 (C-6), 115,5 (C-3',5'), 115,7 (C-4'''), 122,5 (C-2''), 126,0 (C-3'''), 127,7 (C-2',6'), 130,9 (C-1'), 131,1 (C-3''), 156,0 (C-4'), 156,6 (C-5), 156,6 (C-9), 159,9 (C-7), 196,5 (C-4). MS ESI^+ -TOF m/z : 407 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calculado para $\text{M}[\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_5] = 406,2$). Todos os dados obtidos por RMN ^{13}C e ^1H estão em concordância com dados da literatura⁹³.

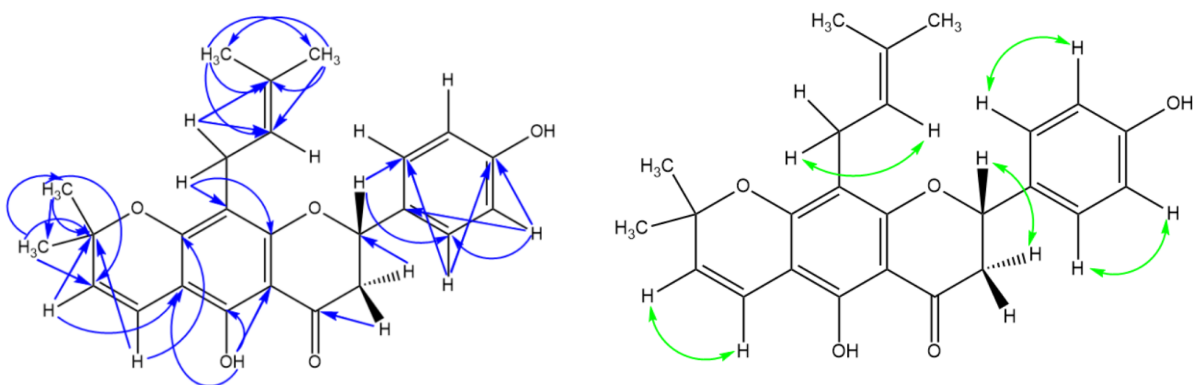


Figura 8: Estrutura do composto lupinifolina com as correlações HMBC (azul) e COSY (verde).

Mundulina (2) (fração RD1-2.3)

As informações dos dados espectroscópicos estão resumidas nas Figuras 9 e 10 e na Tabela 5. O composto 2 mostrou ter uma fórmula molecular $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_4$ de acordo com o ião

quasi-molecular observado a m/z 391 ($M+H$)⁺ e os iões moleculares de sódio a m/z 413 ($M+Na$)⁺ e 803 ($2M+Na$)⁺, de potássio a m/z 429 ($M+K$)⁺ e 819,5 ($2M+K$)⁺, e de amónia a m/z 407 ($M+NH_4$)⁺. O espectro de RMN de ¹³C é similar ao do composto **1**, residindo a diferença no desvio do sinal do C-4' para menores valores de frequência, que sugere a ausência do substituinte 4'-OH. Este dado é corroborado pela correlação do espectro COSY que demonstra que os prótons de cada carbono no anel aromático acoplam uns com os outros. Destas observações espectroscópicas descritas, foi possível concluir que o composto **2** é (*S*)-2-fenil-5-hidroxi-8,8-dimetil-10-(3-metilbut-2-enil)-2,3-di-hidropirano[3,2-*g*]cromen-4-ona, mais conhecido como mundulina⁹⁷.

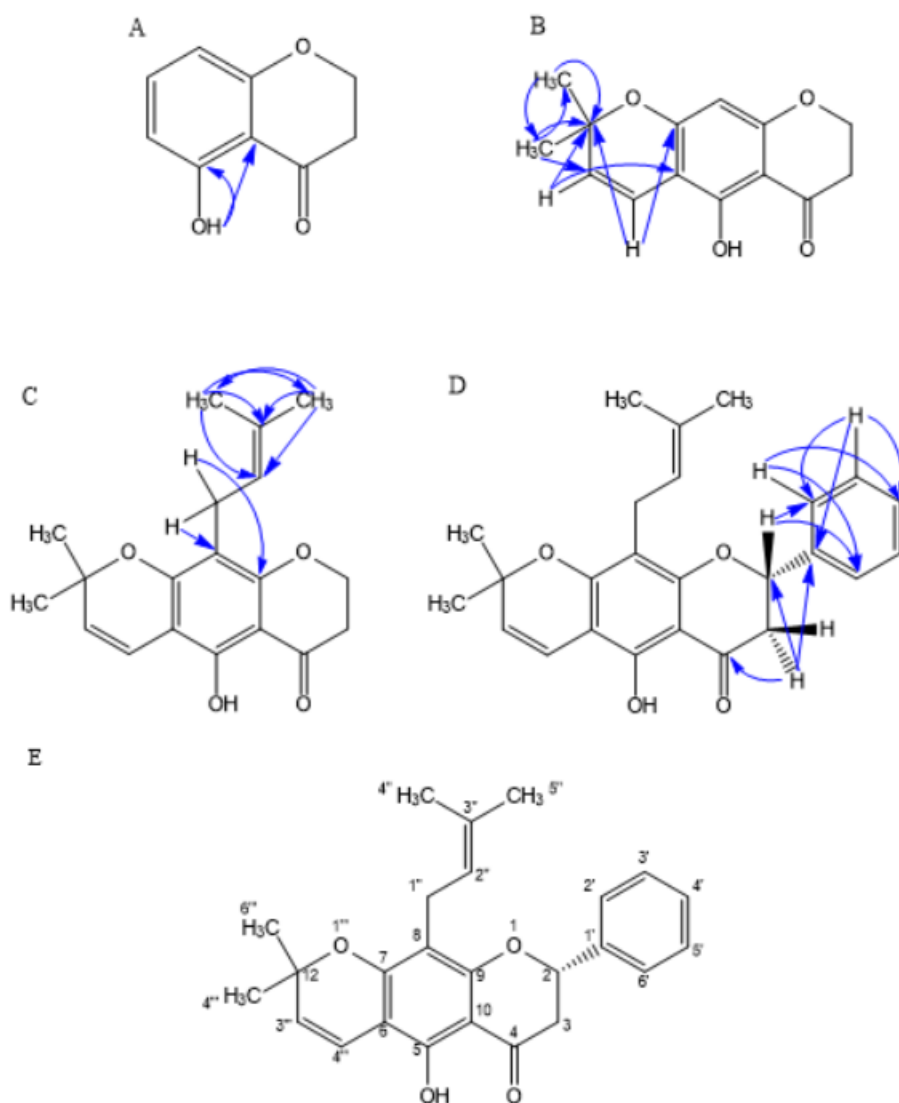


Figura 9: Identificação dos respetivos carbonos e protões na elucidação da estrutura do composto mundulina. A – identificação do anel A e C do flavonoide baseado no RMN HMBC e da ponte de hidrogénio criado pelo grupo hidroxilo do anel A; B – identificação da unidade pirano da estrutura; C – identificação da cadeia prenilo; D – identificação do anel aromático; E – estrutura final com todos os carbonos numerados;

A mundulina é um flavonoide prenilado previamente isolado noutras espécies de planta^{98,99}. Este composto tem um estudo na literatura a descrever a sua atividade inibitória na

enzima $H^+,K^+-ATPase^{100}$, sendo este o único estudo a avaliar a sua atividade biológica. Devido á presença em várias plantas usadas na medicina tradicional este composto poderá apresentar várias atividades biológicas, sendo este, tal como o composto **1**, excelente candidato para futuros estudos de atividades biológicas.

Os dados espectroscópicos da mundulina são as seguintes: (*S*)-2-fenil-5-hidroxi-8,8-dimetil-10-(3-metilbut-2-enil)-2,3-di-hidropirano[3,2-*g*]cromen-4-ona. Óleo amarelado, RMN de 1H (ppm, 300 MHz, $CDCl_3$): δ 1,44 (3H, s, H-6'''), 1,45 (3H, s, H-5'''), 1,66 (6H, s, H-4'' e H-5''), 2,70 (2H, dd, *J* 13,0, 3,0, H-3eq), 3,04 (1H, dd, *J* 17,10, 13,00, H-3ax), 3,22 (2H, d, *J* 7,32, H-1''), 5,16 (1H, t, *J* 7,39, H-2''), 5,23-5,47 (1H, m, H-2), 5,51 (1H, d, *J* 9,96, H-3'''), 6,64 (1H, d, *J* 9,99, H-4'''), 7,39-7,47 (5H, m, H-2',6'), 12,25 (1H, s, 5-OH). RMN de ^{13}C (ppm, $CDCl_3$): δ 17,8 (C-5'''), 21,5 (C-1''), 25,8 (C-4'''), 28,3 (C-5'''), 28,4 (C-6'''). 43,5 (C-3), 78,1 (C-2'''), 78,8 (C-2), 102,7 (C-10), 102,9 (C-8), 108,6 (C-6), 115,7 (C-4'''), 122,5 (C-2''), 125,9 (C-3'''), 127,9 (C-2',6'), 128,6 (C-3',5'), 128,7 (C-4'), 131,1 (C-3''), 138,9 (C-1'), 156,6 (C-9), 159,2 (C-5), 159,9 (C-7), 196,2 (C-4). MS ESI^+ -TOF *m/z*: 391 ($M+H$)⁺, 413 ($M+Na$)⁺, 429 ($M+K$)⁺, 407 ($M+NH_4$)⁺, 803 ($2M+Na$)⁺, 819 ($2M+K$)⁺ (calculado para $M[C_{25}H_{26}O_4] = 390,5$). Todos os dados apresentados estão em concordância com a literatura^{97,99,101}.

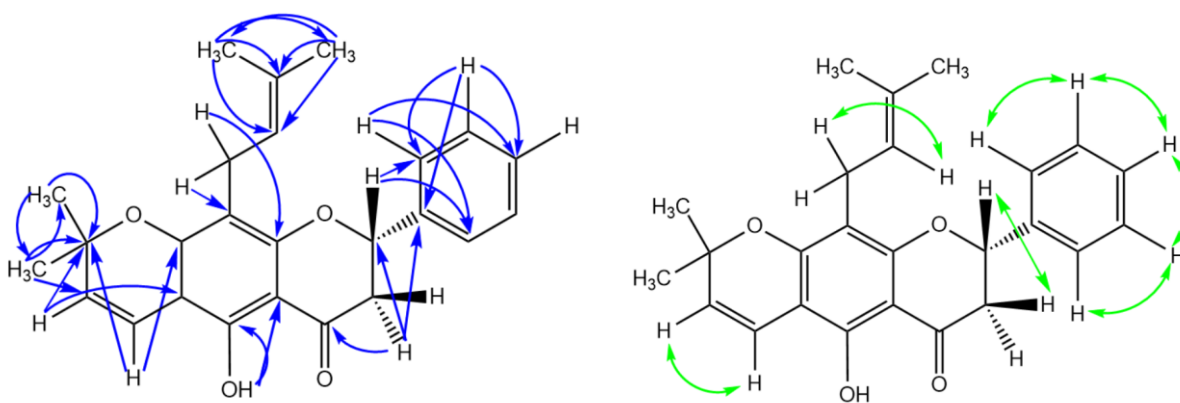


Figura 10: Estrutura do composto mundulina com as correlações HMBC (azul) e COSY (verde).

Composto 3 (fração RD1-2.4)

As informações dos dados espectroscópicos estão resumidas nas Figuras 11 e 12 e na Tabela 5. O composto **3** tem a fórmula molecular $C_{26}H_{28}O_5$ de acordo com o íon quasi-molecular observado a m/z 421 $(M+H)^+$ e os íões moleculares de sódio a m/z 443 $(M+Na)^+$ e 863 $(2M+Na)^+$ e de potássio a m/z 459 $(M+K)^+$. O espectro de RMN de 1H apresenta os mesmos picos que permitem deduzir o anel A e C dos flavonoides descritos em cima, nomeadamente, o pico de protão δ_H 11,99 (1H, s, 5-OH), e pelas correlações HMBC que permitiram a atribuição dos sinais dos carbonos C-5, C-6 e C-10. Os espectros de RMN de ^{13}C e de 1H são idênticos aos do composto **2** com a exceção do C-3 e H-3. Pelo espectro de RMN de ^{13}C verifica-se a presença de um carbono a δ_C 81,4, que do espectro de RMN HSQC e DEPT verificamos que este é um carbono terciário ligado a um protão a δ_H 4,04 (1H, d, J 10,0, H-3). As correlações dos espectros COSY e HMBC (Figura 12) permitiram concluir que existe um grupo metoxilo na posição 3 [δ_C 60,8; δ_H 3,39 (3H, s)]. Do melhor dos nossos conhecimentos, esta estrutura não se encontra na literatura sendo esta a primeira vez que há uma descrição espectroscópica deste composto.

Os dados espectroscópicos do composto **3** são as seguintes: (*S*)-2-fenil-5-hidroxi-3-metoxi-8,8-dimetil-10-(3-metilbut-2-enil)-2,3-di-hidropirano[3,2-g]cromen-4-ona. Óleo amarelado. RMN de 1H (ppm, 300 MHz, $CDCl_3$): δ 1,43 (3H, s, H-5'''), 1,45 (3H, s, H-6'''), 1,64 (6H, s, H-4'' e H-5''), 3,19 (2H, d, J 7,41, H-1''), 3,39 (3H, s, OCH_3), 4,04 (1H, d, J 10,05, H-3), 5,12 (1H, t, J 4,65, H-2''), 5,22 (1H, d, J 10,05, H-2), 5,51 (1H, d, J 10,02, H-3'''), 6,63 (1H, d, J 8,25, H-4'''), 7,44-7,48 (5H, m, H-2',3',4',5',6'), 11,99 (1H, s, 5-OH). RMN de ^{13}C (ppm, $CDCl_3$): δ 17,8 (C-4''), 21,3 (C-1''), 25,8 (C-5''), 28,4 (C-5''' e C-6'''), 78,3 (C-2'''), 82,0 (C-2), 81,4 (C-3), 101,5 (C-10), 103,1 (C-6), 108,7 (C-8), 115,6 (C-4'''), 122,3 (C-2''), 126,1 (C-3'''), 127,1 (C-2',6'), 128,5 (C-4'), 128,9 (C-3',5'), 131,2 (C-3''), 136,8 (C-1'), 156,7 (C-5), 158,5 (C-9), 160,2 (C-7), 195,8 (C-4). MS ESI^+ -TOF m/z : 421 $(M+H)^+$, 443 $(M+Na)^+$, 459 $(M+K)^+$, 863 $(2M+Na)^+$ (calculado para $M[C_{26}H_{28}O_5] = 420,5$).

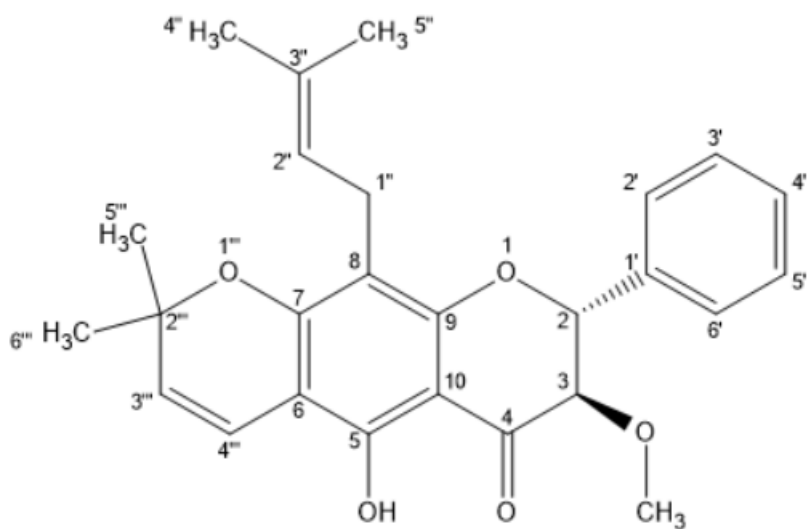


Figura 11: Estrutura do composto 3 com os devidos carbonos identificados, consoante a sua nomenclatura.

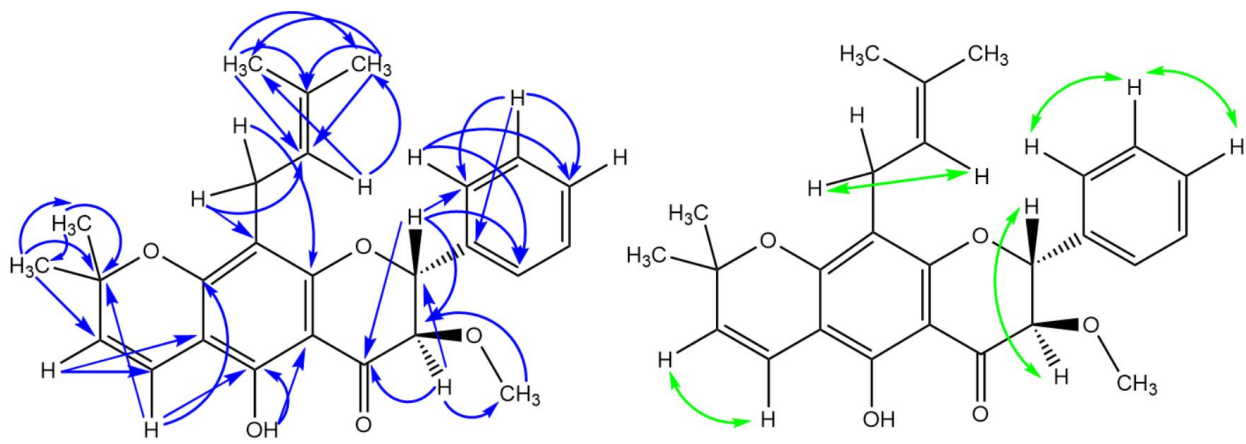


Figura 12: Estrutura do composto 3 com as correlações HMBC (azul) e COSY (verde).

O resumo dos dados espectroscópicos dos compostos **1-3** encontram-se na tabela a seguir:

Tabela 5: Dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C (esquerda) e de RMN de ^1H (direita) dos compostos 1-3 (em ppm).

C	1	2	3	H	1	2	3
1	-	-	-	1	-	-	-
2	78,5	78,8	82,0	2	5,30-5,37 (1H, m)	5,23-5,47 (1H, m)	5,22 (1H, d)
3	43,2	43,5	81,4	3	3,04 (1H, dd, H-3ax) 2,78 (1H, dd, H-3eq)	3,04 (1H, dd) 2,70 (2H, dd)	4,04 (1H, d)
4	196,5	196,2	195,8	4	-	-	-
5	156,6	159,2	156,7	5	-	-	-
6	102,8	108,6	103,1	6	-	-	-
7	159,9	159,9	160,2	7	-	-	-
8	108,6	102,9	108,7	8	-	-	-
9	156,6	156,6	158,5	9	-	-	-
10	102,7	102,7	101,5	10	-	-	-
1'	130,9	138,9	136,8	1'	-	-	-
2'	127,7	127,9	127,1	2'	7,31 (1H, d)	7,39-7,47 (5H, m)	7,44-7,48 (5H, m)
3'	115,5	128,6	128,9	3'	6,87 (1H, d)		
4'	156,0	128,7	128,5	4'	-		
5'	115,5	128,6	128,9	5'	6,87 (1H, d)		
6'	127,7	127,9	127,1	6'	7,31 (1H, d)	3,22 (2H, d)	3,19 (2H, d)
1''	21,5	21,5	21,3	1''	3,20 (2H, d)		
2''	122,5	122,5	122,3	2''	5,14 (1H, t)	5,16 (1H, t)	5,12 (1H, t)
3''	131,1	131,1	131,2	3''	-	-	-
4''	25,8	25,8	25,8	4''	1,65 (3H, s)	1,66 (6H, s)	1,64 (6H, s)
5''	17,8	17,8	17,8	5''	1,64 (3H, s)	1,66 (6H, s)	1,64 (6H, s)
1'''	-	-	-	1'''	-	-	-
2'''	78,1	78,1	78,3	2'''	-	-	-
3'''	126,0	125,9	126,1	3'''	5,50 (1H, d)	5,51 (1H, d)	5,51 (1H, d)
4'''	115,7	115,7	115,6	4'''	6,63 (1H, d)	6,64 (1H, d)	6,63 (1H, d)
5'''	28,3	28,3	28,4	5'''	1,44 (3H, s)	1,45 (3H, s)	1,43 (3H, s)
6'''	28,4	28,4	28,4	6'''	1,44 (3H, s)	1,44 (3H, s)	1,45 (3H, s)
				C5-OH	12,23 (1H, s)	12,25 (1H, s)	11,99 (1H, s)
				OCH₃	-	-	3,39 (3H, s)

5.2 Caracterização dos extratos por UHPLC-MS

Os compostos identificados nos extratos etanólicos da raiz, do caule e das folhas estão indicadas nas tabelas 6-8. Os respectivos tempos de retenção, comprimentos de onda dos máximos de absorção, iões moleculares e os principais iões fragmento observados em MSⁿ também são indicados nas referidas tabelas.

No extrato da raiz foram identificados 8 compostos, enquanto no caule e folhas foram identificados 10 compostos. O pico 1^R apresenta um ião pseudo-molecular igual ao pico 2^C a [M-H]⁻ m/z 593, dando origem a um ião fragmento a m/z 473 (-120 mu) característico de flavonas com uma unidade C-hexosídeo¹⁰². Os restantes iões produtos a m/z 503, 431 e 311 (perdas de -90, -162 e -282 [162+120] mu, respetivamente) sugerem a presença de duas unidades hexosídeo, contudo a presença de -162 mu sugere que a segunda hexose esteja ligada via ligação O-hexosídeo. A perda -18 mu do ião produto a m/z 575, resulta da perda entre o grupo 2''-hidroxilo do açúcar com os grupos 5- ou 7-hidroxilo da aglicona¹⁰³, e os iões produto [Aglicona+113] e [Aglicona+83] a m/z 383 e 352, respetivamente, corroboram esta afirmação, visto que esta situação não é comum em 8-C-hexoses. Este composto foi tentativamente identificado como genisteína-C-hexosídeo-O-hexosídeo. Atendendo a que a genisteína já foi isolada da *Pterospartum tridentatum*, a presença deste derivado não será estranha. O pico 2^R apresenta um ião pseudo-molecular [M-H]⁻ (m/z 639) e o ião fragmento a m/z 593 no MS². Sabe-se que nas condições experimentais utilizadas é possível haver a formação de artefactos com ácido fórmico¹⁰⁴, por isso este do pico 2^R deverá ser um aduto do pico 1^R com o ácido fórmico (593+46 mu). Ou seja, este composto 2^R, será um artefacto do pico 1^R.

O pico 3^R, tal como o pico 3^C, apresentam um ião pseudo-molecular [M-H]⁻ a m/z 447, obtendo-se um ião produto a m/z 285 pela perda de -162 mu, característico de flavonas O-hexosídeo¹⁰³. A fragmentação da aglicona (285 mu) no MS² produziu vários fragmentos que são característicos do campferol, nomeadamente, a m/z 285, 257, 243 e 229. Estes iões fragmento são idênticos aos descritos em Fabre¹⁰⁵ que estudaram em detalhe a fragmentação deste composto. Assim, este composto foi identificado como campferol-O-glucosídeo. Não foi possível determinar a posição do glicosídeo neste composto. A presença da aglicona campferol foi identificada no extrato do caule e das folhas nos picos 8^C (Tabelas 8). Além disso a presença

de derivados glicosilados de campferol nesta espécie foi previamente reportada por Roriz⁵⁵. O pico 4^R e o pico 4^C apresentam o mesmo íão pseudo-molecular [M-H]⁻ a m/z 491 e os fragmento detetados (m/z 445 e 283) são característicos de derivados biocanina um isoflavonoide anteriormente isolado do arbusto *P. tridentatum*^{55,56}, encontrado no extrato das folhas (pico 8^F, tabela 9) e do caule (pico 7^C, tabela 8). Contudo, a razão massa/carga detetada indica que estamos na presença de mais um aduto, neste caso de um derivado de biocanina A com ácido fórmico. Estes derivados foram identificados na raiz e no caule nos picos 7^R e 11^C, a m/z 283 e 297, respetivamente. Ambos os compostos apresentam perdas de -15, -28 e -44 mu, que são característicos de compostos contendo grupos metoxilos como substituintes e perdas de CO e CO₂ do anel C. Assim, devido á descrição deste tipo de fragmentação noutros trabalhos, o pico 7^R foi identificado como biocanina A e o pico 10^C como metilprunetina/metilbiocanina A, sendo que este último não é possível determinar no nosso caso devido á similaridade estrutural dos compostos. Outros compostos com estruturas semelhantes á biocanina A foram identificados nos extratos da raiz, tal como a daidzeína e genisteína nos picos 8^R e 9^R/9^C a m/z 253 e 269, respetivamente. Estes compostos apresentam uma fragmentação semelhante no MS² nas perdas de -28 e -44 mu da aglicona, contudo a genisteína já foi isolado desta planta ao contrário da daidzeína. Um estudo realizado por Cunha⁵⁶ revelou que não foi possível identificar níveis de daidzeína nos extratos metanólicos da planta, mas foi possível identificar daidzina, a forma glicosilada da daidzeína.

Os picos 5^R, 5^C e 6^F apresentam o mesmo íão pseudo-molecular a m/z 431. Os íões fragmento obtidos em MS² a m/z 311 (-120 um), 341 (-90) e 269 (-162) são característicos de compostos contendo substituintes C-hexosídeo. Esta fragmentação foi previamente descrita na planta *P. tridentatum* para o composto genisteína-6-C-glucosídeo. Contudo a diferença no tempo de retenção do pico 6^F sugere a presença de um composto com uma estrutura similar. No nosso caso, esta fragmentação sugere que é o composto genistina, outro composto já identificado na planta. O pico 6^R, 6^C e 5^F têm um íão pseudo-molecular a m/z 461, e foi identificado como a 5,5'-di-hidroxi-3'-metoxi-isoflavona-7-*O*-glicosídeo, um composto previamente descrito em extratos aquosas de *P. tridentatum*^{16,106}. Devida às características de fragmentação deste composto serem idênticas às descritas por Vitor¹⁰⁶ como 5,5'-di-hidroxi-3'-metoxi-isoflavona-7-*O*-glicosídeo, o composto detetado foi associado a essa estrutura.

Tabela 6: Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do ultravioleta (λ_{max}), dados do espectro de massa e identificação de compostos presentes no extrato etanólico da raiz de *Pterospartum tridentatum*.

Pico	Tr (min)	λ_{max} (nm)	Ião Molecular [M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (%)	MS ³ (%)	Tentativa de Identificação
1 ^R	9.18	260, 192	593	473 (100), 503 (4), 431 (3), 311 (3), 383 (1), 352(1), 575 (1)		genisteína-C-hexosídeo-O-hexosídeo
2 ^R	9.87	259	639	621 (8), 593 (12), 549 (7), 519 (83), 477 (42), 431 (100), 357 (6), 315 (2)	268 (100)	genisteína-C-hexosídeo-O-hexosídeo
3 ^R	10.53	262	447	327 (100), 357 (3), 393 (<1), 369 (<1), 299 (1), 285 (<1), 429 (1)		campferol-O-glucosídeo
4 ^R	11.14	255	491	283 (100), 445 (16)	268 (100), 240 (5)	biocanina-O-glucosídeo
5 ^R	11.98	196, 261	431	311 (100), 341(4), 269 (1)	282 (100), 311 (1), 293 (18)	genisteína-6-C-glucosídeo
6 ^R	12.28	262	461	341 (100), 446 (3), 371 (2), 326 (1)		5,5'-di-hidroxi-3'-metoxi-isoflavona-7-O-glucosídeo
7 ^R	15.35	255	283	268 (100), 283 (23), 239 (4), 255 (2), 196 (1)		biocanina A
8 ^R	16.08	249, 301	253	253 (100), 225 (2), 209 (1), 197 (1)		daidzeína
9 ^R	18.62	260	269	269 (100), 241 (86), 225 (97), 147 (18)		genisteína

Dos 10 compostos identificados no extrato do caule, 9 foram também encontrados no extrato da raiz. O pico 1^C apresenta um ião pseudo-molecular [M-H]⁻ a m/z 445, com perdas de -162, -120 e -90 mu, que corresponde a perda de uma unidade glicosídeo, e perdas de -15

correspondente a perdas de grupos metilo. Por outro lado, um composto com as mesmas características de fragmentação foi descrito por Vitor¹⁰⁶, o que possibilita a sua identificação como sendo a sissotrina.

Tabela 7: Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do ultravioleta (λ_{max}), dados do espectro de massa e identificação de compostos presentes no extrato etanólico do caule de *Pterospartum tridentatum*.

Pico	Tr (min)	λ_{max} (nm)	Ião Molecular [M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (%)	MS ³ (%)	Tentativa de Identificação
1 ^c	8.69	192, 254	445	325 (7), 283 (100), 355 (1), 268 (2), 430 (1)	268 (100), 283 (4), 255 (2), 240 (3), 224 (1), 190 (1)	sissotrina
2 ^c	9.15	194, 260	593	473 (100), 431 (6), 550 (1), 515 (1), 503 (1), 431 (7), 415 (1), 371 (1), 323 (1), 311 (1), 281 (1), 269 (4)		genisteína-C-hexosídeo-O-hexosídeo
3 ^c	10.49	198, 261	447	429 (100), 415 (47), 403 (15), 315 (43), 387 (7), 327 (6), 297 (8), 271 (33), 249 (40), 237 (3), 219 (3), 207 (12), 197 (7), 193 (3), 179 (11), 163 (17), 152 (16)		campferol-O-glucosídeo
4 ^c	11.13	194, 255	491	445 (100), 283 (24)		biocanina-O-glucosídeo
5 ^c	11.94	247, 273, 227, 206	431	311 (100), 341 (3), 268 (7)		genisteína-6-C-glucosídeo
6 ^c	12.28	199, 262	461	341 (100)		5,5'-di-hidroxi-3'-metoxi-isoflavona-7-O-glucosídeo

7^C	15.44	194, 255	283	283 (100), 328 (46), 566 (42)	252 (100)	biocanina A
8^C	16.57	198, 261	285	285 (88), 267 (4), 257 (51), 241 (27), 229 (4), 217 (53), 199 (100), 175 (5), 149 (4)		campferol
9^C	18.88	193, 260	269	269 (100), 225 (4), 201 (3), 181 (3)		genisteína
10^C	21.03	260	297	297 (100), 282 (10), 269 (6), 253 (1), 241 (1), 225 (1)		metilprunetina/ metilbiocanina A

No extrato da folha foram identificados 10 compostos, 7 dos quais já foram identificados no extrato da raiz e do caule. O pico 1^F apresenta um ião pseudo-molecular [M-H]⁻ a m/z 465 com perdas de -120, -90 e -18 mu. Este tipo de fragmentação foi observado em MS², tal como em MS³, por Roriz⁵⁵ descrevendo que estes picos são característicos de um flavonol com duas unidades hidroxilo e C-hexosídeo, correspondendo a uma estrutura tipo di-hidroquercetina-6-C-hexosídeo, pelo que os picos 1^F, 2^F e 3^F devem ser estereoisómeros. Contudo, no nosso caso não foi possível identificar o tipo de açúcar ligado á estrutura.

O pico 4^F apresenta um ião pseudo-molecular a m/z 479, idêntico ao descrito por Paulo¹⁶ como sendo a miricetina-6-C-glucosídeo. As perdas de -120 e -90 mu sugerem a presença de um C-hexosídeo e as perdas de -28, -18 e -42 apontam para quebras no anel C do composto. A fragmentação deste composto foi previamente descrita por Paulo¹⁶ e Roriz⁵⁵ que possibilita a sua identificação neste extrato. O pico 7^F apresenta um ião pseudo-molecular a m/z 477 com iões produto a m/z 459 (-18 mu), 387 (-90 mu), 357 (-120 mu) e 315 (-162) que são característicos de grupos O-hexosídeos. No entanto, a fragmentação da aglicona a m/z 297 mostrou ter um fragmento de m/z 282 (-15 mu) que indica a presença de um grupo metilo. Este tipo de fragmentação foi descrito para a isorhamnetina-3-O-glucosídeo¹⁰⁷ noutras espécies de planta mas nunca na *Pterospartum tridentatum*, embora seja comum na família Fabaceae¹⁰⁸. Similarmente, o pico 10^F também tem sido descrito noutras espécies mas nunca neste arbusto sendo também comum na família Fabaceae. O ião-pseudomolecular a m/z 269 apresenta fragmentos característicos do composto apigenina (m/z 241 (-28 u.m.a), 227 (-42 u.m.a), 225 (-

44 u.m.a) e 201 (-68 u.m.a)) que é confirmado por Fabre¹⁰⁵, que estudaram em detalhe a fragmentação deste composto.

Tabela 8: Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do ultravioleta (λ_{max}), dados do espectro de massa e identificação de compostos presentes nos extratos etanólicos da folha de *Pterospartum tridentatum*.

Pico	Tr (min)	λ_{max} (nm)	Ião Molecular [M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (%)	MS ³ (%)	Tentativa de Identificação
1 ^F	8.61	198, 227, 293	465	447 (6), 375 (10), 345 (100), 303 (7)	327 (100), 301 (18), 299 (15), 285 (11), 195 (11), 167 (18), 151 (18)	di-hidroquercetina- 6-C-hexosídeo
2 ^F	9.23	199, 217, 293	465	447 (6), 375 (10), 345 (100), 303 (7)	327 (100), 301 (18), 299 (15), 285 (11), 195 (11), 167 (18), 151 (18)	di-hidroquercetina- 6-C-hexosídeo
3 ^F	9.45	199, 217, 290	465	447 (6), 375 (10), 345 (100), 303 (7)	327 (100), 301 (18), 299 (15), 285 (11), 195 (11), 167 (18), 151 (18)	di-hidroquercetina- 6-C-hexosídeo
4 ^F	10.89	199, 220, 290	479	359 (100), 389 (3)	331 (100), 341 (36), 316 (4), 313 (9), 300 (18), 222 (24), 207 (8), 194 (15), 167 (26)	miricetin-6-C- glucosídeo
5 ^F	12.83	200, 262	461	446 (12), 371 (7), 341 (100), 299 (23), 281 (38)		5,5'-di-hidroxi-3'- metoxi-isoflavona- 7-O-glucosídeo
6 ^F	13.37	197, 261	431	416 (1), 385 (1), 341 (2), 311 (100), 299 (3), 268 (8), 224 (1)	283 (100), 268 (1), 225 (1), 149 (1)	genistina
7 ^F	14.73	198, 232, 289	477	459 (9), 433 (6), 387 (6), 357 (70), 315 (100),	297 (75), 282 (100), 269 (13), 177 (12),	isoramnetina-3-O- glucosídeo

				297 (10)	119 (8)	
8^F	17.09	198, 239, 255	283	283 (100), 268 (55), 255 (91), 237 (8), 217 (9), 212 (5), 200 (4), 181 (3), 169 (4), 149 (4)		derivado de biocanina A
9^F	18.28	198, 261	285	285 (100), 267 (6), 257 (27), 241 (33), 229 (7), 217 (64), 201 (10), 199 (7), 195 (6), 185 (6), 177 (7), 149 (11), 93 (8)		não identificado
10^F	20.36	195, 261	269	269 (30), 251 (12), 241 (38), 227 (86), 225 (100), 201 (12), 197 (21), 176 (36), 151 (10)	183 (100)	apigenina

5.3 Atividade biológica dos extratos

5.3.1 Efeitos dos extratos etanólicos da raiz, do caule e da folha na viabilidade celular.

Os extratos de planta são misturas complexas de compostos que podem apresentar uma vasta gama de aplicações terapêuticas. No entanto, dada a complexidade desta mistura, para além que compostos com atividade predominantemente benéfica, podem existir compostos que apresentem considerável citotoxicidade.

Deste modo, foi numa primeira fase avaliado o potencial citotóxico de diferentes concentrações dos extratos sobre os macrófagos. Esta etapa inicial permitiu definir a concentração não citotóxica a usar nos ensaios biológicos subsequentes. Pelos resultados obtidos, o extrato de raiz mostrou ser o menos tóxico para as células, causando apenas morte considerável para concentrações acima de 250 µg/mL (Figura 7). Por sua vez os extratos do caule e das folhas causaram uma diminuição na viabilidade de forma linear com o aumento da

concentração usada. Face aos dados obtidos, foi selecionada a concentração 100 µg/mL, uma vez que em todos os extratos esta apresentava uma viabilidade entre 90 a 100%.

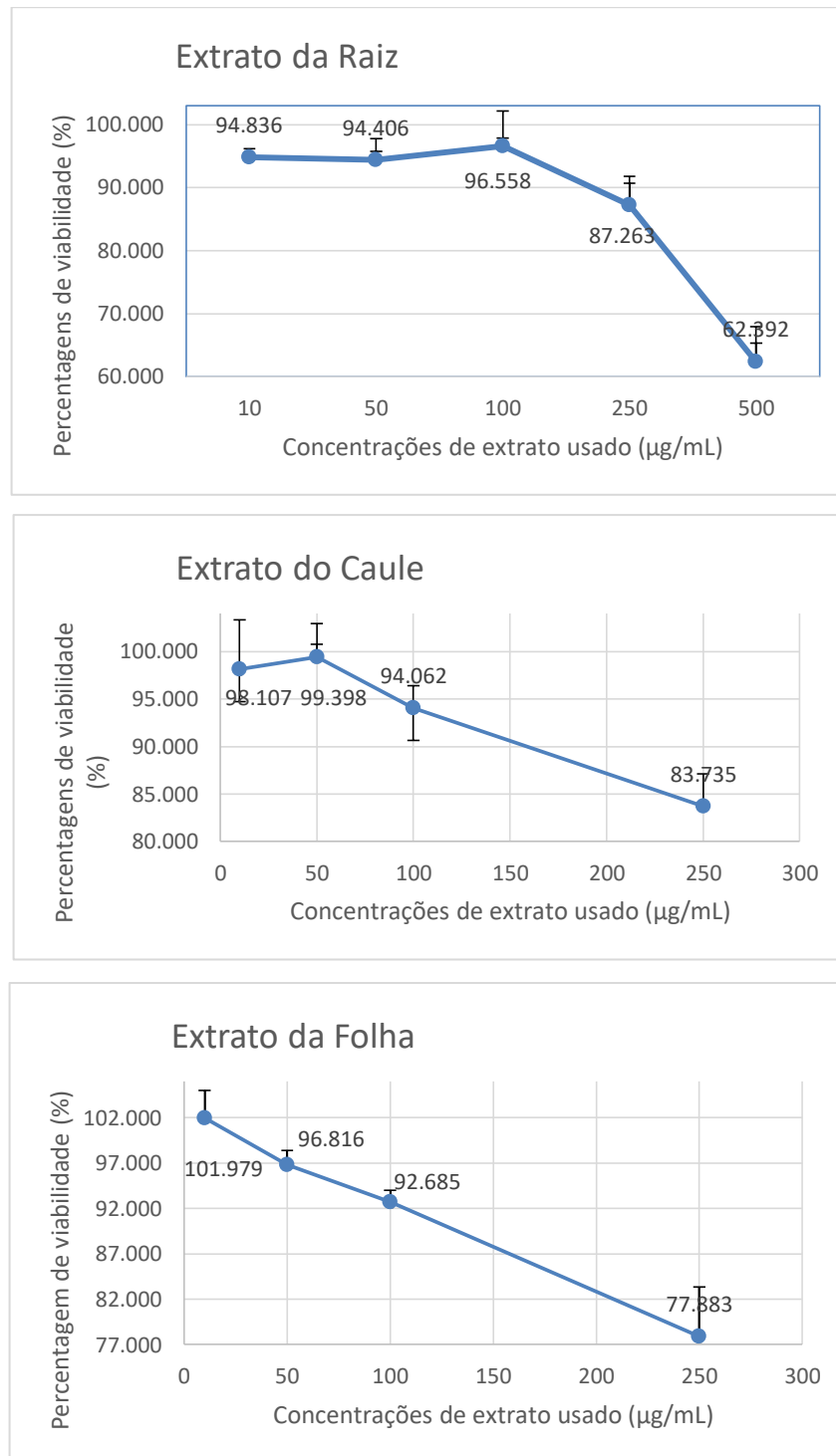


Figura 13: Efeito dos extratos na viabilidade das células RAW 264,7. A viabilidade encontra-se representada em termos de percentagem relativamente às células não tratadas (controlo), considerado 100%.

5.3.2. Avaliação da produção de NO, potencial atividade *scavenging* e atividade antioxidante.

As folhas da planta *Pterospartum tridentatum* têm sido usadas na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças anti-inflamatórias¹⁵. Como tal, estudou-se o efeito que os extratos etanólicos da raiz, caule e folhas possam ter na modulação da produção do mediador inflamatório NO. A produção de NO por macrófagos é crítica para a resolução de processos infecciosos, contudo a sua produção excessiva e/ou continuada constitui um fator de desenvolvimento de doenças inflamatórias crónicas¹⁰⁹. Assim, avaliou-se o efeito que a concentração não-citotóxica que os extratos (100 µg/mL) têm na produção de NO induzido pelo LPS, um polissacarídeo endotóxico que estimula o processo inflamatório. Tal como esperado, 24 h após a estimulação com LPS, verificou-se que a concentração de NO nas células aumentou drasticamente (32,3 µM). Surpreendentemente, os extratos do caule e da folha, diminuíram significativamente a produção de NO induzida pelo LPS (15,7 µM e 14,9 µM, respetivamente), enquanto que o extrato de raiz provocou uma diminuição também ela significativa embora menos acentuada (21,9 µM). A diferença entre o controlo e as células tratadas só com o extrato da raiz, caule e folha manteve-se relativamente estável apresentando uma concentração de NO de 1,3 µM, 0,8 µM e 5,3 µM, respetivamente (Figura 14). Tal facto indica-nos que os extratos não contêm compostos suscetíveis de ativar os macrófagos e pelo contrário aparentam conter importantes agentes anti-inflamatórios.

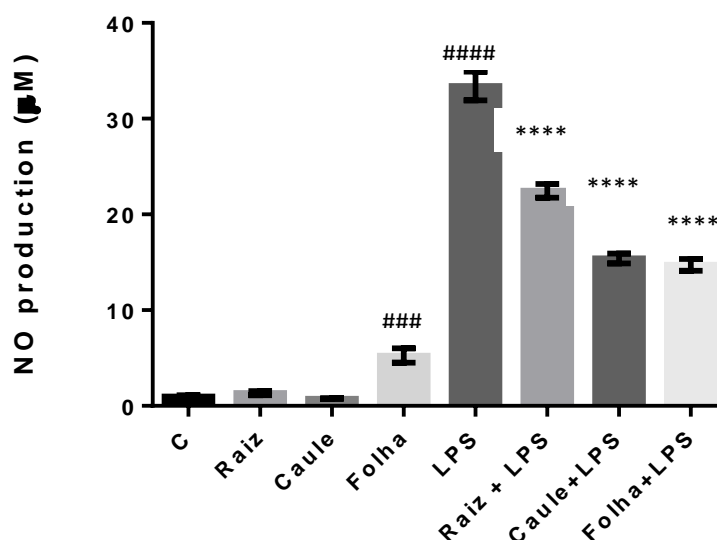


Figura 14: Efeito dos diferentes extratos de *Pterospartum tridentatum* na produção de NO induzida por LPS em macrófagos. Células RAW foram tratadas com 100 µg/mL de cada extrato durante 1h sendo posteriormente expostas a 1 µg/mL de LPS por mais 24 h. No final foi avaliada a concentração de nitritos no meio (um reflexo do NO produzido) pelo método de Griess. Os dados apresentados representam a média \pm desvio padrão de 3 experiências independentes. Comparação entre grupos foi feita por aplicação de teste ANOVA com pós teste Dunnett (###P<0,001; C vs extrato; ####P<0,0001; C vs LPS; ****P<0,0001; LPS vs extratos+LPS).

De modo a excluir a possibilidade dos extratos estarem a reagir diretamente com o NO, procedeu-se à avaliação da sua capacidade *scavenging*. Para tal usou-se o composto *S*-nitroso-*N*-acetilpenicilamina (SNAP) que liberta óxido nítrico em condições fisiológicas, mimetizando a produção de NO pela iNOS. Quando comparado com o controlo (39.5 µM) não se verificou grande alteração nos níveis de NO presentes no meio suplementado com nenhum dos extratos (36.4 µM, 32.8 µM e 36.3 µM para a raiz, caule e folhas, respetivamente) (Figura 15). Assim, exclui-se a possibilidade dos extratos interferirem com a reação de Griess ou de inativarem diretamente a molécula de NO. As diminuições mostradas na figura 14 resultaram portanto de um efeito a nível da diminuição da expressão da enzima iNOS ou da diminuição da sua atividade.

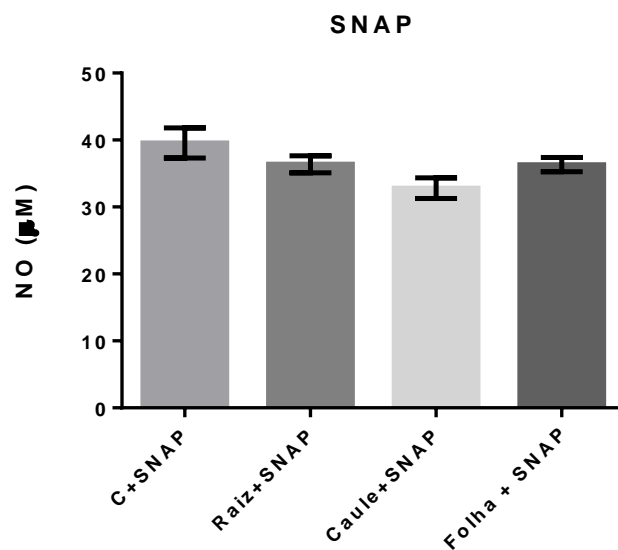


Figura 15: Efeito dos diferentes extratos de *Pterospartum tridentatum* na concentração de NO (em µM) libertado pelo SNAP, em condições fisiológicas. O meio de cultura foi tratado com 300 µM de SNAP e 100 µM de extrato e mantidas a 37°C durante 3 h. A concentração de nitritos no meio foi determinada pela reação de Griess.

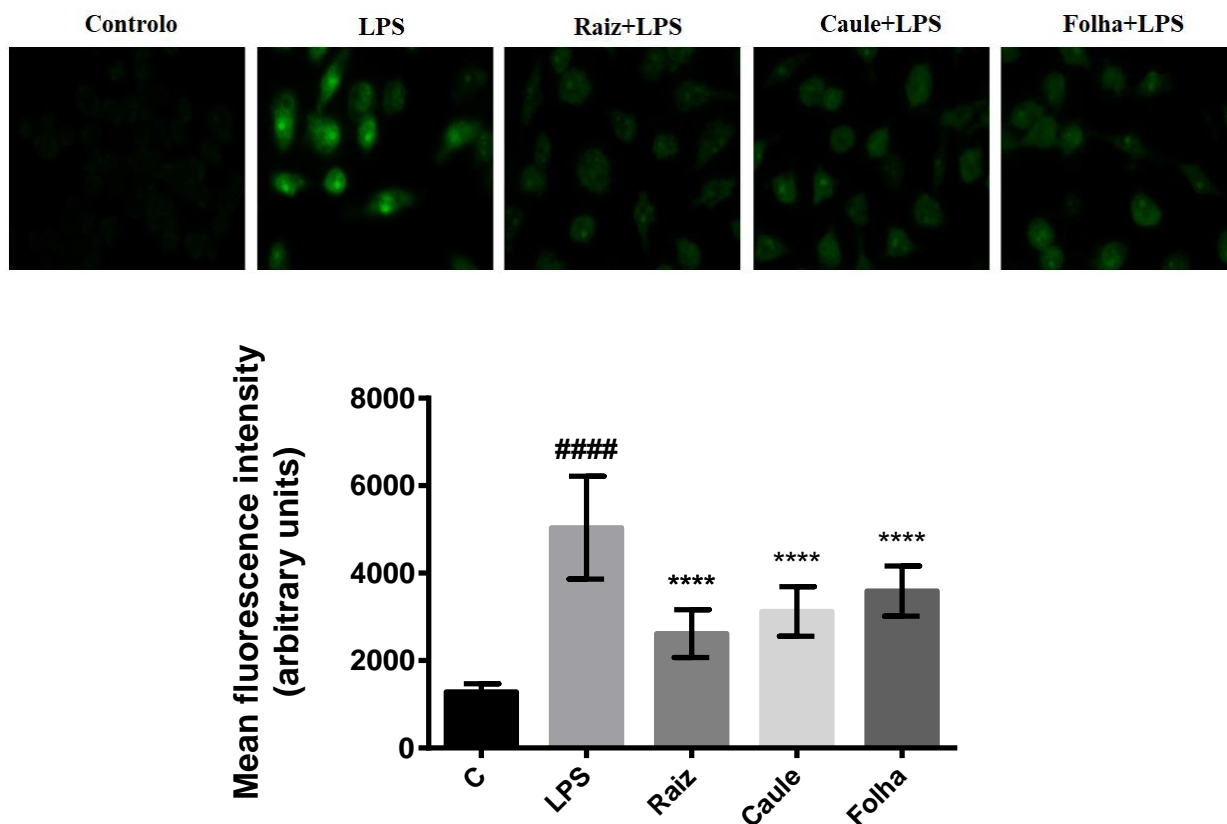


Figura 16: Intensidade de fluorescência emitida pelas células macrófagos RAW 264.7 tratadas com *N*-acetilcisteína (controlo positivo) ou extrato etanólico de *Pterospartum tridentatum* após ter sido induzido estresse oxidativo com LPS. As células foram analisadas com um microscópio fluorescente com ampliação de 63X. Comparação entre grupos foi feita por aplicação de teste T para comparar o C vs LPS (#### $P < 0,0001$) e um teste ANOVA com pós-teste Dunnett para comparar o LPS vs extratos+LPS (**** $P < 0,0001$).

Da caracterização química dos extratos e dos compostos já isolados na planta, verifica-se que existe uma grande quantidade de compostos flavonoides, sendo que alguns deles podem explicar esta inibição de NO. A genisteína, a prunetina, a rutina e os derivados de biocanina A, foram descritos na literatura como sendo inibidores da produção de NO e $\text{TNF}\alpha$ ^{38,110}, pela diminuição da ativação de fatores de transcrição ligados ao processo inflamatório como o NF- κB ^{62,111,112}. Por outro lado, os flavonoides apresentam uma reconhecida atividade antioxidante¹¹³ o que permite explicar a observação da diminuição de stress oxidativo em macrófagos tratados com LPS e com os extratos. Um estudo realizado com as partes aéreas de

Pterospartum tridentatum de modo a avaliar a influência dos diferentes estados vegetativos no conteúdo fenólico e na atividade antioxidante¹⁸ provou que de fato esta planta tem um grande conteúdo fenólico independentemente do tempo de colheita. Os dados por nós obtidos vêm assim corroborar o grande atividade antioxidante atribuída aos extratos desta planta¹¹⁴. A forte atividade antioxidante deve-se em grande parte à ação sinérgica que os flavonoides apresentem nos extratos naturais das plantas. Sabe-se que a genisteína, a biocanina e a daidzeína têm uma grande atividade antioxidante sobre espécies reativas de oxigênio¹¹⁵ e atividade inibitória em vários mediadores celulares que previnem a expressão de enzimas antioxidantes^{116,117}, tais como, superóxido dismutase e glutathione peroxidase. Isto em combinação com outros flavonoides presentes nos extratos leva a uma marcada diminuição do stress oxidativo nas células tratadas com os extratos de *P. tridentatum*.

5.3.3. Efeito dos extratos etanólicos na expressão proteica de iNOS e COX-2

Tal como referido anteriormente, a iNOS é expressa após indução, sendo responsável pela produção de NO através da oxidação da L-arginina. A inibição da produção desta proteína ou a inibição dos mediadores inflamatórios que levam à expressão da mesma constitui um alvo importante como medida terapêutica para certas doenças inflamatórias. Como os extratos demonstraram grande capacidade para inibir a produção de NO induzida pelo LPS fomos investigar se esta resultaria da diminuição da expressão proteica da iNOS. Observámos que o aumento dos níveis de NO nas células estimuladas com LPS se deve a um aumento significativo da expressão de iNOS algo amplamente relatado na literatura¹¹⁸. Nas condições em que as células foram pré-tratadas com os extratos verificou-se uma diminuição significativa dos níveis de iNOS, sendo as diminuições de 22.6%, 21.7% e 20.13% para os extratos da raiz, caule e folha respetivamente (Figura 17). Estes resultados mostram que a inibição da produção de NO é devida, pelo menos parcialmente, ao efeito inibitório que os extratos têm na expressão da iNOS. De notar que a efetividade com que os diferentes extratos o fazem acompanha na mesma ordem as diminuições observadas a nível da produção de NO.

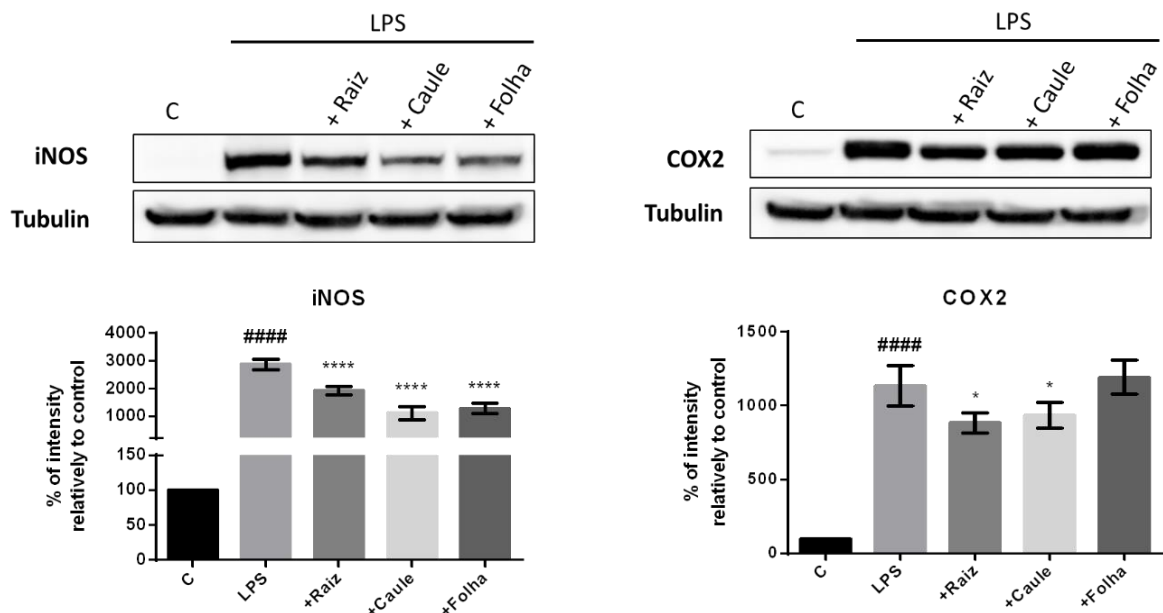


Figura 17: Efeito dos extrato etanólicos de *Pterospartum tridentatum* na expressão proteica de iNOS e COX-2 induzida por LPS em macrófagos RAW 264.7. Extratos celulares das diferentes condições foram separados eletroforéticamente em géis SDS-PAGE 12% e sujeitos a Western blot para avaliação da expressão de iNOS e COX-2. A comparação entre grupos foi feita por aplicação de teste T para comparar o C vs LPS (####P<0,0001) e um teste ANOVA com pós-teste Dunnett para comparar o LPS vs extratos+LPS (*P<0,05; ****P<0,0001).

No processo inflamatório, aquela que é uma das principais moléculas e como tal também um dos alvos terapêuticos preferenciais é a COX-2. Tal como mencionado anteriormente, a COX-2 é uma enzima responsável pela formação de mediadores inflamatórios tais como, tromboxano e várias prostaglandinas como a PGI₂. Atendendo à sua relevância na inflamação avaliámos também o efeito dos extratos na expressão proteica de COX-2 induzida por LPS. Tal como o que se verificou com a iNOS, a expressão da COX-2 é diminuída pelos extratos da raiz e do caule. Por sua vez o extrato das folhas, sendo o mais eficaz na inibição da expressão de iNOS, não tem efeitos significativos na modulação de COX-2. Estes resultados, em termos farmacológicos, mostram-se promissores atendendo a que estes extratos conseguem inibir dois dos principais mediadores inflamatórios que tendem a ser alvos para o tratamento de sintomas de inflamação. A presença de vários flavonoides nos três extratos poderá explicar estes resultados.

Na nossa análise foi possível identificar uma diversidade de flavonoides, alguns deles flavonoides prenilados. Esta família de compostos apresenta uma grande diversidade de propriedades biológicas dependentes da sua estrutura. Os flavonoides prenilados por vezes apresentam uma maior bioatividade que os flavonoides devido á sua maior lipofilicidade¹¹⁹, apresentando uma maior afinidade às membranas biológicas. Apesar de haver menos estudos a avaliar as atividades biológicas dos flavonoides prenilados, estes apresentam várias características biológicas relevantes. Por exemplo, a xanto-humol¹²⁰ inibe o NF- κ B ao suprimir a fosforilação do I κ B α . Como só foi possível identificar flavonoides prenilados no extrato da raiz, a presença destes compostos poderá ser uma das razões pela qual o extrato da raiz apresentou um melhor efeito inibitório na expressão da iNOS e COX-2 quando comparada com o extrato das folhas. Contudo futuros estudos que se foquem no isolamento de compostos nos extratos etanólicos das folhas de *P. tridentatum* podem conferir esta afirmação

Os flavonoides, ao contrário dos flavonoides prenilados, têm sido exaustivamente descritos na literatura como tendo uma grande atividade anti-inflamatória. Muitos destes tendem a diminuir a concentração proteica dos mediadores inflamatórios, tais como a iNOS, COX-2 e o TNF- α , e até mesmo inibir a transcrição dos mesmos. Dos flavonoides identificados verificou-se que a genisteína, o campferol e a biocanina A estão presentes em todos os extratos estudados, sendo todos estes compostos descritos na literatura como moduladores das concentrações proteicas de alguns mediadores inflamatórios. Existem vários estudos na literatura a descrever a interação da genisteína e da biocanina A com o NF- κ B¹²¹. Estes compostos suprimem a ligação do NF- κ B ao ADN, acabando por suprimir a transcrição dos genes *Nos2* e *Ptgs2*, que codificam a iNOS e COX-2, respetivamente. Estes também são responsáveis pela inibição de outros fatores de transcrição tais como STAT-1¹²², ERK1/2 e JAK^{123,124} sendo estas outras cascatas celulares responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios. O flavonol campferol, embora menos estudado que a genisteína e a biocanina, também tem sido descrito como um composto com atividade anti-inflamatória^{125,126}. Tal como a genisteína, o campferol diminui a concentração de iNOS, COX-2 e CRP¹²⁷ ao inibir a fosforilação do I κ B α e do IKK. Deste modo, estes compostos em combinação com outros flavonoides presentes nos extratos, tais como a rutina e a prunetina, suportam a observada diminuição da expressão de iNOS e COX-2.

Embora haja estes benefícios nos compostos identificados nos extratos, os flavonoides têm uma atividade benéfica dependente das concentrações aplicadas, significando que acima de uma determinada concentração estes podem vir a provocar efeitos deletérios. Da Figura 17 verificamos que o extrato da folha, ao contrário do extrato da raiz e do caule, aumenta a expressão de COX-2 induzida pelo LPS. Isto poderá ser explicado pela presença de vários flavonoides em concentrações muito mais elevadas no extrato da folha do que nos extratos da raiz e do caule. Este comportamento foi observado com alguns flavonoides, como a quercetina que exibe efeitos citotóxicos em culturas renais¹²⁸ e efeitos genotóxicos¹²⁹ para concentrações maiores que 75 e 30µM, respetivamente. Atendendo a estes resultados, será necessário em futuros trabalhos aprofundar o estudo da composição química dos extratos das folhas de modo a serem identificados as moléculas responsáveis pelo observado aumento da COX-2.

5.3.4. Efeito dos extratos etanólicos na transcrição dos genes inflamatórios *Nos2*, *Ptgs2*, *Il1b*, *Il6* e *Tnfa*.

Decidimos de seguida averiguar se a diminuição dos níveis das proteínas iNOS e COX-2 causadas pelos extratos se deviam a um efeito inibitório a nível da transcrição dos respetivos genes. Alargou-se ainda a análise a outros mediadores inflamatórios relevantes: IL-1β, IL-6 e TNF-α. Pela observação da figura 18 verificou-se que os três extratos inibem significativamente a transcrição da *Nos2*, sendo o gene *Ptgs2* apenas significativamente inibido pelo extrato da raiz. Estes resultados apresentam o mesmo perfil daqueles obtidos na nível da análise das respetivas proteínas (Figura 17) mostrando que os extratos conterão compostos com capacidade para reprimirem alguns fatores de transcrição ligados ao processo inflamatório.

Relativamente à análise dos efeitos sobre a transcrição dos outros mediadores inflamatórios os resultados variaram de acordo com o gene e com a porção da planta da qual foi obtido o extrato. Enquanto que a transcrição de *Il1b* induzida por LPS foi significativamente diminuída por todos os extratos, os genes de *Il6* e *Tnfa* ou não foram modulados ou a sua expressão foi paradoxalmente aumentada. Este efeito é particularmente relevante para o *Tnfa* que é induzido pelos extratos do caule e da folha. Tal facto vêm uma vez mais demonstrar que os extratos podem conter inúmeros compostos, alguns com propriedades benéficas mas outros

com características indesejáveis. Deste modo a presença de compostos citotóxicos ou pro-inflamatórios nos extratos da folha não pode ser excluída dada a pouca informação que existe sobre a *Pterospartum tridentatum*.

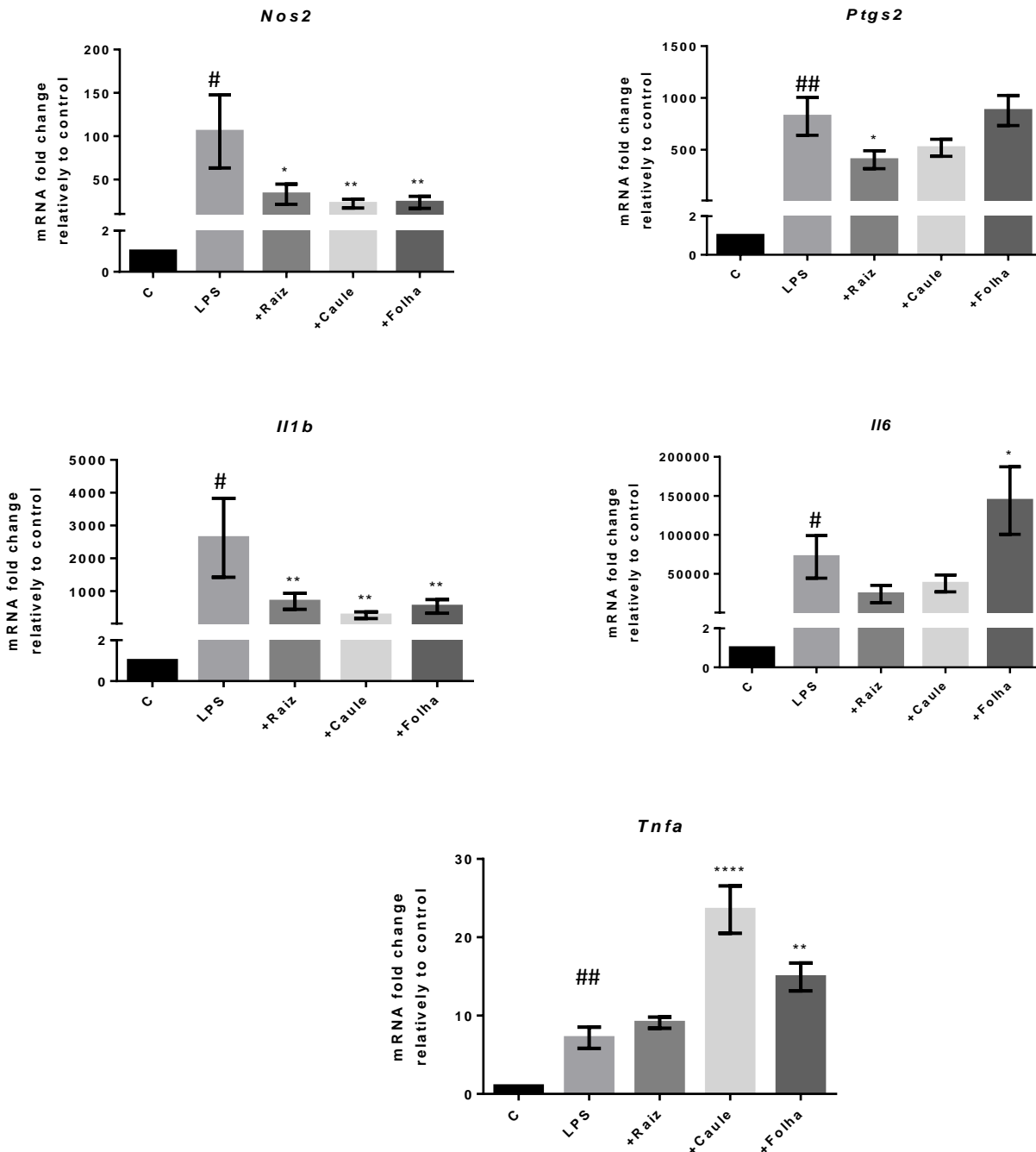


Figura 18: Efeito dos extratos etanólicos do *Pterospartum tridentatum* na transcrição dos genes inflamatórios *Il1b*, *Nos2*, *Ptgs2*, *Il6* e *Tnfa* induzidos por LPS. Células RAW 264.7 foram tratadas com 100 µg/mL de cada extrato durante 1 h sendo posteriormente expostas a 1 µg/ml de LPS por mais 24 h. O ARN foi extraído e retrotranscrito sendo posteriormente analisada a transcrição dos genes *Il1b*, *Nos2*, *Ptgs2*, *Il6* e *Tnfa* por qPCR. Comparação entre grupos foi feita por aplicação de teste T para comparar o

C vs LPS (##P<0,01) e um teste ANOVA com pós-teste Dunnett para comparar o LPS vs extratos+LPS (*P<0,05; ****P<0,0001).

Tal como acima mencionado, os compostos já isolados e identificados nas diferentes seções da planta têm efeitos inibitórios de certos mediadores inflamatórios. Destes compostos a genisteína é talvez o mais estudado. A nível molecular interage com várias vias de sinalização que são essenciais para a cascata inflamatória. A genisteína inibe a expressão da COX-2 e iNOS ao bloquear a fosforilação da unidade p65 do NF- κ B¹¹¹ prevenindo a sua migração para o núcleo. Dado que o NF- κ B é um dos mediadores essenciais na inflamação, consequentemente, a genisteína impedirá também a transcrição de vários outros mediadores dependentes do NF- κ B¹³⁰ tais como, TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-1 β . Dada a sua presença nos três extratos estudados, podemos deduzir que a genisteína é um dos compostos responsáveis pela desregulação da COX-2, iNOS, IL-1 β e IL-6. Como os extratos das plantas têm uma grande variedade de compostos, a genisteína poderá interagir sinergicamente com outros compostos presentes nos extratos, ampliando os seus efeitos. A biocanina¹³¹, daidzeína¹³², prunetina³⁸, campferol¹³³, isoramnetina¹³⁴ e a rutina⁴⁰, são compostos presentes nos extratos estudados que se sabe interferirem com o complexo IKK suprimindo a MAPK, Janus cinase, p38 MAPK e o NF- κ B. Deste modo pode haver uma ação sinérgica com a genisteína, o que explica a relevante atividade observada.

5.4. Atividade Anti-acetilcolinesterase

A *Pterospartum tridentatum* é um arbusto descrito pela medicina tradicional como tendo uma variedade de efeitos benéficos para a saúde. Contudo não há informação na literatura que descreva a sua atividade anticolinérgica, apesar da planta conter compostos potencialmente inibitórios da acetilcolinesterase. Assim, após os resultados obtidos para atividade anti-inflamatória passou-se para a avaliação da atividade anti-acetilcolinesterase. Os resultados encontram-se resumidos na Figura 19.

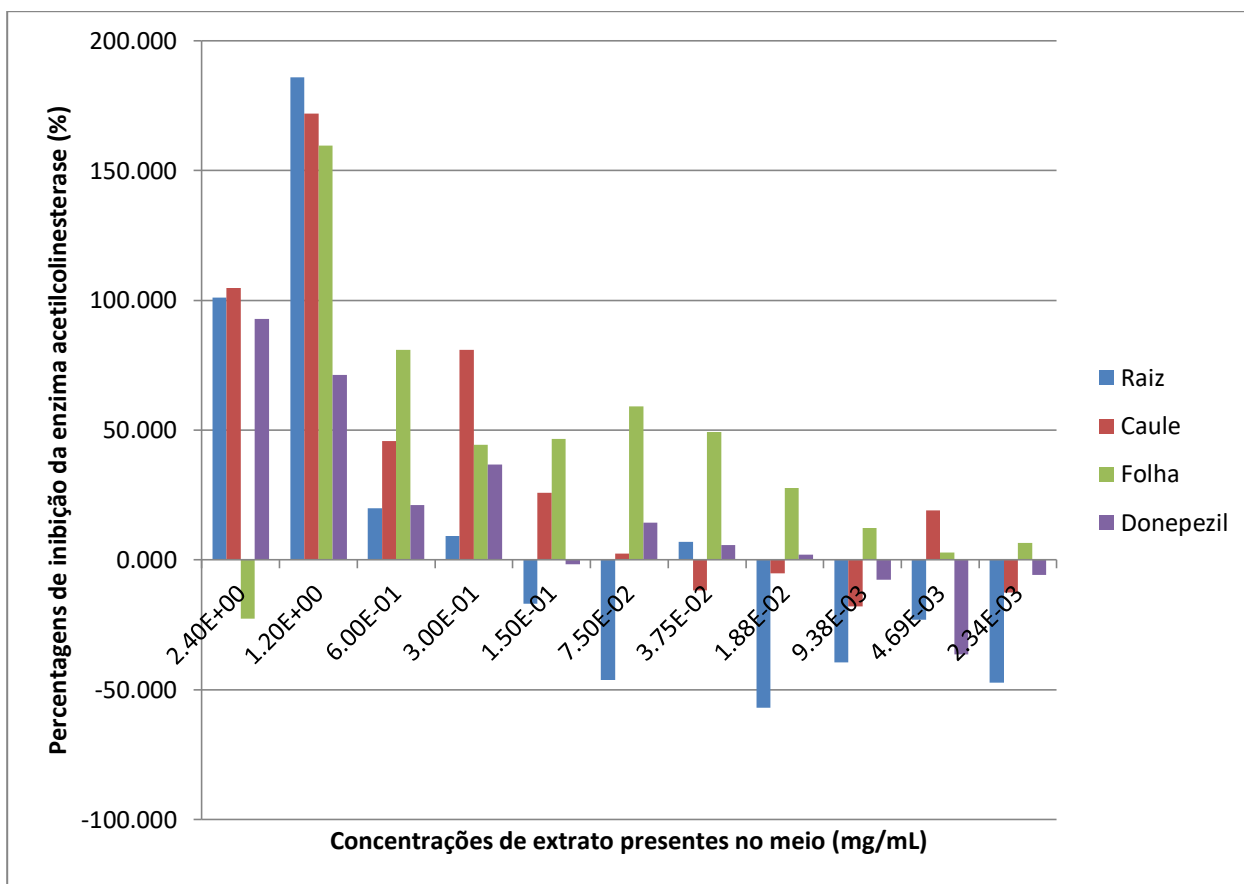


Figura 19: Efeito dos extratos etanólicos do *Pterospartum tridentatum* na atividade acetilcolinesterase *in chemico*. A leitura das absorvâncias da mistura enzima+extrato foi lida aos 0 s, 150 s, 300 s e 450 s, sendo estes valores usados para calcular a percentagem de inibição.

Após análise dos resultados, verificamos vários problemas com o método e vários erros experimentais que ocorreram durante o ensaio. Primeiro, verificamos que os dados experimentais obtidos não são significativamente relevantes para comprovar a atividade anti-acetilcolinesterase dos extratos, sendo que se teria de realizar mais ensaios (pelo menos N=3) para obter relevância estatística. Segundo, verificamos que o extrato do caule e da folha inibem significativamente mais a acetilcolinesterase do que o donepezil. Este inibidor reversivelmente inativa a AChE a concentrações muito baixas devido á sua grande afinidade ao receptor sigma-1 (14.6 nM)¹³⁵ da acetilcolinesterase. Quando se compara as concentrações de extrato usado com as concentrações de donepezil usadas verificamos que o controlo não apresenta uma atividade inibitória como é descrita na literatura. Isto significa que ocorreram erros

experimentais na realização do ensaio que levou a uma diluição das concentrações do controle. Outro fator que poderá estar a influenciar os resultados são as concentrações de extrato usado. Segundo o método, a concentração de extrato usado era de 5 mg/mL que foi diluído em série entre os poços de modo a obter concentrações decrescentes do poço 1 até ao poço 11. Esta concentração poderá ser demasiado alta para poder avaliar a atividade inibitória que o extrato possa ter, visto que existem vários compostos que podem ter efeitos nefastos acima de uma determinada concentração. Uma forma de melhorar este método para se poder avaliar corretamente a atividade inibitória, teríamos de estudar a concentração ótima dos extratos de modo a garantir a viabilidade enzimática durante o ensaio.

Embora não tínhamos obtido resultados que possam justificar a utilização da *Pterospartum tridentatum* como inibidor da acetilcolinesterase, sabemos que existem vários compostos presentes nos extratos que têm atividade anti-acetilcolinesterase. A genisteína e a daidzeína, presentes nos extratos aquosos das partes aéreas, são referidas como tendo efeitos neuroprotetores devido á sua similaridade estrutural com o estrogénio^{63,64}. A genisteína tem a mesma capacidade protetora que o estrogénio^{136,137}, reprimindo a agregação de amiloides sem apresentar efeitos oncogénicos e diminuindo os níveis de astrócitos nas zonas afetadas. Isto leva a uma melhoria significativa na memória de reconhecimento espacial de curto prazo e na retenção de conceitos aprendido¹³⁶. A biocanina A inibe a acetilcolinesterase¹³⁸ numa relação dependente da concentração aplicada. A prunetina também tem características neuroprotetoras devido á sua capacidades de inibir a enzima PDE4³⁷, responsável por certas doenças neurológicas tais como esquizofrenia. Contudo não existem estudos a avaliar como este composto influencia a enzima acetilcolinesterase. Futuros estudos que utilizem outras metodologias ou que apresentem um maior número de resultados poderão ajudar a corroborar a nossa hipótese de que a *Pterospartum tridentatum* poderá ter atividade neuroprotetora.

6. Conclusões

Este estudo visou caracterizar quimicamente os compostos presentes nos extratos etanólicos da raiz, caule e folha do arbusto *Pterospartum tridentatum*. Este foi o primeiro estudo que visa isolar possíveis compostos que possam estar presentes na raiz desta planta e o

primeiro a avaliar quimicamente a raiz, o caule e as folhas como secções individuais da planta. Procedemos ainda ao isolamento e elucidação estrutural de diversos compostos no extrato da raiz, tendo sido isolados 2 compostos previamente isolados noutras plantas (lupinifolina e mundulina) e um composto caracterizado pela primeira vez. Foram ainda avaliadas as atividades anti-inflamatória e anti-acetilcolinesterase dos diferentes extratos.

Observou-se que os extratos do caule e da raiz, secções que não são muito usadas na medicina tradicional, são aquelas que de facto apresentam maior atividade anti-inflamatória, inibindo a transcrição de vários genes inflamatórios, a expressão de COX-2 e iNOS e a produção de NO induzida por LPS. Por outro lado o extrato das folhas, embora inibindo significativamente a expressão de iNOS e a produção de NO, tem também efeitos potenciadores inflamatórios que se traduzem no aumento da expressão de COX-2 e transcrição de *IL6* e *Tnfa*. Este facto é relevante pois as partes aéreas do arbusto são as mais usadas. Os dados por nós obtidos vieram demonstrar que para o tratamento de afeções de natureza inflamatória seria mais benéfico o uso da raiz ou mesmo do caule.

Quanto á atividade anti-acetilcolinesterase, embora não tínhamos obtido resultados significativos, abriu-se o caminho para novos estudos que podem ajudar a elucidar a conexão entre os efeitos neuroprotetores dos compostos presentes nos extratos e as possíveis propriedades neuroprotetoras de *P. tridentatum*.

7. Referências Bibliográficas

1. Lim, J. E., Kou, J., Song, M., Pattanayak, A., Jin, J., Lalonde, R. & Fukuchi, K. MyD88 deficiency ameliorates β -amyloidosis in an animal model of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **179**, 1095–1103 (2011).
2. von Bernuth, H., Picard, C., Jin, Z., Pankla, R., Xiao, H., Ku, C., Chrabieh, M., Mustapha, I. M., Ghandil, P., Camcioglu, Y., Vasconcelos, J., Sirvent, N., Guedes, M., Vitor, A. B., Herrero-Mata, M. J., Aróstegui, J. I., Rodrigo, C., Alsina, L., Ruiz-Ortiz, E., Juan, M., Fortuny, C., Yagiie, J., Antón, J., Pascal, M., Chang, H., Janniere, L., Rose, Y., Garty, B., Chapel, H., Issekutz, A., Maródi, L., Rodriguez-Gallego, C., Banchereau, J., Abel, L., Li, X., Chaussabel, D., Puel, A. & Casanova, J. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science* (80-.). **321**, 691–696 (2008).
3. Bajpai, V. K., Sharma, A., Kang, S. C. & Baek, K. H. Antioxidant, lipid peroxidation inhibition and free radical scavenging efficacy of a diterpenoid compound sugiol isolated from *Metasequoia glyptostroboides*. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **7**, 9–15 (2014).
4. Johnston, W. H., Karchesy, J. J., Constantine, G. H. & Craig, M. Antimicrobial activity of some Pacific Northwest woods against anaerobic bacteria and yeast. *Phytother. Res.* **15**, 586–588 (2001).
5. Muhammad, I., Mossa, J. S., AlYahya, M. A., Ramadan, A. F. & ElFeraly, F. S. Further antibacterial diterpenes from the bark and leaves of *Juniperus procera* Hochst ex Endl. *Phyther. Res.* **9**, 584–588 (1995).
6. Taviano, M. F., Marino A., Trovato, A., Bellinghieri, V., Melchini, A., Dugo, P., Cacciola, F., Donato, P., Mondello, L., Güvenç, A., De Pasquale, R. & Miceli, N.. *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Ball. 'berries' from Turkey: Comparative evaluation of phenolic profile, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities. *Food Chem. Toxicol.* **58**, 22–29 (2013).
7. Wettasinghe, M. & Shahidi, F. Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis* L.) seeds. *Food Chem.* **67**, 399–414 (1999).
8. Lin, Q. Y., Jin, L. J., Cao, Z. H. & Xu, Y. P. Inhibition of inducible nitric oxide synthase

- by *Acanthopanax senticosus* extract in RAW264.7 macrophages. *J. Ethnopharmacol.* **118**, 231–236 (2008).
9. Weli, A. M., Al-Hinai, J. R. K., Al-Mjrafi, J. M. A., Alnaaimi, J. R. S., Hossain, M. A., Saeed, S. & Aktar, M. S. Effect of different polarities leaves crude extracts of *Omani juniperus* excels on antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities and their biochemical screening. *Asian Pacific J. Reprod.* **3**, 218–223 (2014).
 10. Taylor, J. L. S., Rabe, T., McGaw, L. J., Jäger, A. K. & Van Staden, J. Towards the scientific validation of traditional medicinal plants. *Plant Growth Regul.* **34**, 23–37 (2001).
 11. V. Ciddi. Natural products derived from plants as a source of drugs. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* **3**, 200–201 (2012).
 12. Teixeira, G. & Pereira, A. L. Winged stems in *Pterospartum tridentatum* : morphoanatomical study. *Acta Bot. Gall.* **151**, 103–109 (2004).
 13. Neves, J., Matos, C. & Moutinho, C. Usos populares de plantas medicinais da flora transmontana. (2008).
 14. Castroviejo, S. Flora Ibérica LXXXVIII. Leguminosae - *Pterospartum*. *Consejo Superior de Investigaciones Científicas*. **7**, 133–137 (2015).
 15. Novais, M. H., Santos, I., Mendes, S. & Pinto-Gomes, C. Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *J. Ethnopharmacol.* **93**, 183–195 (2004).
 16. Paulo, A., Martins, S., Branco, P., Dias, T., Borges, C., Rodrigues, A. I., Costa, M. C., Teixeira, A. & Mota-Filipe, H. The opposing effects of the flavanoids isoquercitrin and sissotrin, isolated from *Pterospartum tridentatum*, on Oral Glucose Tolerance in Rats. *Phytother. Res.* **22**, 539–543 (2008).
 17. Gonçalves, S., Gomes, D., Costa, P. & Romano, A. The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Ind. Crops Prod.* **43**, 465–471 (2013).
 18. Coelho, M. T., Gonçalves, J. C., Alves, V. & Martins, M. M.-. Antioxidant activity and phenolic content of extracts from different *Pterospartum tridentatum* populations growing in Portugal. *Procedia Food Sci.* **1**, 1454–1458 (2011).

19. Bazuine, M., van den Broek, P. J. A. & Maassen, J. A. Genistein directly inhibits GLUT4-mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **326**, 511–4 (2005).
20. Szilv, B. & Heged, A. Genistein isoflavone glycoconjugates in sour cherry (*Prunus cerasus* L.) cultivars. **166**, 215–222 (2015).
21. Daruházi, Á. E., Kiss, T., Vecsernyés, M., Szente, L., Szöke, É. & Lemberkovics, É. Investigation of transport of genistein, daidzein and their inclusion complexes prepared with different cyclodextrins on Caco-2 cell line. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **84**, 112–116 (2013).
22. Rodríguez-Landa, J. F., Cueto-Escobedo, J., Puga-Olguín, A., Rivadeneyra-Dominguez, E., Beernal-Morales, B., Herrera-Huerta, E. V. & Santos-Torres, A. The phytoestrogen genistein produces similar effects as 17 β -estradiol on anxiety-like behavior in rats at 12 weeks after ovariectomy. **2017**, (2017).
23. Liu, X., Wang, T., Liu, X., Cai, L., Qi, J., Zhang, P. & Li, Y. Biochanin A protects lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver injury in mice by activating the Nrf2 pathway and inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *Int. Immunopharmacol.* **38**, 324–331 (2016).
24. Kole, L., Giri, B., Manna, S. K., Pal, B. & Ghosh, S. Biochanin-A, an isoflavon, showed anti-proliferative and anti-inflammatory activities through the inhibition of iNOS expression, p38-MAPK and ATF-2 phosphorylation and blocking NF- κ B nuclear translocation. *Eur. J. Pharmacol.* **653**, 8–15 (2011).
25. Aditya, N. P., Shim, M., Yang, H., Lee, Y. & Ko, S. Antiangiogenic effect of combined treatment with curcumin and genistein on human prostate cancer cell line. *J. Funct. Foods* **8**, 204–213 (2014).
26. Ali, F., Naz, F., Jyoti, S. & Hasan, Y. Protective effect of Genistein against hepatotoxicity in Swiss albino rats. *J. Pharm. Anal.* **5**, 51–57 (2015).
27. Chang, K. L., Kung, M. L., Chow, N. H. & Su, S. J. Genistein arrests hepatoma cells at G2/M phase: involvement of ATM activation and upregulation of p21waf1/cip1 and Wee1. *Biochem Pharmacol* **67**, 717–726 (2004).
28. Arunkumar, E. & Anuradha, C. V. Genistein promotes insulin action through adenosine

- monophosphate-activated protein kinase activation and p70 ribosomal protein S6 kinase 1 inhibition in the skeletal muscle of mice fed a high energy diet. *Nutr. Res.* **32**, 617–25 (2012).
29. Al-nakkash, L., Markus, B., Bowden, K., Batia, L. M., Prozialeck, W. C. & Broderick, T. L. Effects of Acute and 2-Day Genistein Treatment on Cardiac Function and Ischemic Tolerance in Ovariectomized Rats. *Gend. Med.* **6**, 488–497 (2009).
 30. Baluchnejadmojarad, T. & Roghani, M. Chronic administration of genistein improves aortic reactivity of streptozotocin-diabetic rats: Mode of action. *Vascul. Pharmacol.* **49**, 1–5 (2008).
 31. Lee, D. S. & Lee, S. H. Genistein, a soy isoflavone, is a potent α -glucosidase inhibitor. *FEBS Lett.* **501**, 84–86 (2001).
 32. Kim, S., Shin, H., Kim, S. Y., Kim, J. H., Lee, Y. S., Kim, D. & Lee, M. Genistein enhances expression of genes involved in fatty acid catabolism through activation of PPAR α . *Mol. Cell. Endocrinol.* **220**, 51–58 (2004).
 33. Chen, C. Y. & Bakhiet, R. M. Age decreased steady-state concentrations of genistein in plasma, liver, and skeletal muscle in Sprague-Dawley rats. *Mech. Ageing Dev.* **127**, 344–348 (2006).
 34. Ahn, T.-G., Yang, G., Lee, H., Kim, M., Choi, H., Park, K., Lee, S., Kook, Y. & An, H. Molecular mechanisms underlying the anti-obesity potential of prunetin, an O-methylated isoflavone. *Biochem. Pharmacol.* **85**, 1525–1533 (2013).
 35. Bae, M., Woo, M., Kusuma, I. W., Arung, E. T., Yang, C. H. & Kim, Y. Inhibitory Effects of Isoflavonoids on Rat Prostate Testosterone 5 α -Reductase. *J. Acupunct. Meridian Stud.* **5**, 319–322 (2012).
 36. Ko, W. C., Shih, C. M., Lai, Y. H., Chen, J. H. & Huang, H. L. Inhibitory effects of flavonoids on phosphodiesterase isozymes from guinea pig and their structure-activity relationships. *Biochem. Pharmacol.* **68**, 2087–2094 (2004).
 37. Lee, H. J., Lee, S. Y., Lee, M. N., Kim, J., Chang, G. T., Seok, J. H. & Lee, C. J. Inhibition of secretion, production and gene expression of mucin from cultured airway epithelial cells by prunetin. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **25**, 1196–1200 (2011).
 38. Yang, G., Ham, I. & Choi, H.-Y. Anti-inflammatory effect of prunetin via the

- suppression of NF- κ B pathway. *Food Chem. Toxicol.* **58**, 124–32 (2013).
39. Piegholdt, S., Pallauf, K., Esatbeyoglu, T., Speck, N., Reiss, K., Ruddigkeit, L., Stocker, A., Huebbe, P. & Rimbach, G. Biochanin A and prunetin improve epithelial barrier function in intestinal CaCo-2 cells via downregulation of ERK, NF- κ B, and tyrosine phosphorylation. *Free Radic. Biol. Med.* **70**, 255–64 (2014).
 40. Choi, K.-S., Kundu, J. K., Chun, K.-S., Na, H.-K. & Surh, Y.-J. Rutin inhibits UVB radiation-induced expression of COX-2 and iNOS in hairless mouse skin: p38 MAP kinase and JNK as potential targets. *Arch. Biochem. Biophys.* **559**, 38–45 (2014).
 41. Choi, S., Lim, T., Hwang, M. K., Kim, Y., Kim, J., Kang, N. J., Jang, T. S., Park, J., Yeom, M. Y. & Lee, K. W. Rutin inhibits B[a]PDE-induced cyclooxygenase-2 expression by targeting EGFR kinase activity. *Biochem. Pharmacol.* **86**, 1468–1475 (2013).
 42. Chen, W.-Y., Huang, Y., Yang, M., Lee, C., Chen, C., Yeh, C., Pan, P., Horng, C., Kuo, W. & Kuan, Y. Protective effect of rutin on LPS-induced acute lung injury via down-regulation of MIP-2 expression and MMP-9 activation through inhibition of Akt phosphorylation. *Int. Immunopharmacol.* **22**, 409–413 (2014).
 43. Choi, J.-H., Lim, T., Hwang, M. K., Kim, Y., Kim, J., Kang, N. J., Jang, T. S., Park, J., Yeom, M. H. & Lee, K. W. Anti-thrombotic effect of rutin isolated from *Dendropanax morbifera* Leveille. *J. Biosci. Bioeng.* **xx**, 1–6 (2015).
 44. Jang, J.-W., Lee, J., Hur, H., Kim, T., Joo, S. & Piao, M. Rutin improves functional outcome via reducing the elevated matrix metalloproteinase-9 level in a photothrombotic focal ischemic model of rats. *J. Neurol. Sci.* **339**, 75–80 (2014).
 45. Dhanya, R., Arun, K. B., Syama, H. P., Nisha, P., Sundaresan, A., Kumar, T. R. S. & Jayamurthy, P. Rutin and quercetin enhance glucose uptake in L6 myotubes under oxidative stress induced by tertiary butyl hydrogen peroxide. *Food Chem.* **158**, 546–54 (2014).
 46. Tian, R., Yang, W., Xuc, Q., Gao, L., Huo, J., Ren, D. & Chen, X. Rutin ameliorates diabetic neuropathy by lowering plasma glucose and decreasing oxidative stress via Nrf2 signaling pathway in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **771**, 84–92 (2016).
 47. Song, K., Kim, S., Na, J., Park, J., Kim, J., Kim, J. & Kwon, J. Rutin attenuates ethanol-

- induced neurotoxicity in hippocampal neuronal cells by increasing aldehyde dehydrogenase 2. *Food Chem. Toxicol.* **72**, 228–233 (2014).
48. Panda, S. & Kar, A. Antithyroid effects of naringin, hesperidin and rutin in l-T4 induced hyperthyroid rats: Possible mediation through 5'DI activity. *Pharmacol. Reports* **66**, 1092–1099 (2014).
 49. Yeh, C.-H., Yang, J.-J., Yang, M.-L., Li, Y.-C. & Kuan, Y.-H. Rutin decreases lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibition of oxidative stress and the MAPK–NF- κ B pathway. *Free Radic. Biol. Med.* **69**, 249–257 (2014).
 50. Deng, B., Cao, Y., Fang, S., Shang, X., Yang, W. and Qian, C. Variation and stability of growth and leaf flavonoid content in *Cyclocarya paliurus* across environments. *Ind. Crops Prod.* **76**, 386–393 (2015).
 51. Fernandez, J., Reyes, R., Ponce, H., Oropeza, M., VanCalsteren, M.-R., Jankowski, C. & Campos, M. G. Isoquercitrin from *Argemone platyceras* inhibits carbachol and leukotriene D4-induced contraction in guinea-pig airways. *Eur. J. Pharmacol.* **522**, 108–115 (2005).
 52. Hara, S., Morita, R., Ogawa, T., Segawa, R., Takimoto, N., Suzuki, K., Hamadate, N., Hayashi, S.-m., Odachi, A., Ogiwara, I., Shibusawa, S., Yoshida, T. & Shibutani, M. Tumor suppression effects of bilberry extracts and enzymatically modified isoquercitrin in early preneoplastic liver cell lesions induced by piperonyl butoxide promotion in a two-stage rat hepatocarcinogenesis model. *Exp. Toxicol. Pathol.* **66**, 225–234 (2014).
 53. Fujii, Y., Kimura, M., Ishii, Y., Yamamoto, R., Morita, R., Hayashi, S.-m., Suzuki, K. & Shibutani, M. Effect of enzymatically modified isoquercitrin on preneoplastic liver cell lesions induced by thioacetamide promotion in a two-stage hepatocarcinogenesis model using rats. *Toxicology* **305**, 30–40 (2013).
 54. Hosikian, A., Lim, S., Halim, R., & Danquah, M. K. Chlorophyll extraction from microalgae: A review on the process engineering aspects. *Int. J. Chem. Eng.* **2010**, (2010).
 55. Roriz, C. L., Barros, L., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C. & Ferreira, I. C. F. R. *Pterospartum tridentatum*, *Gomphrena globosa* and *Cymbopogon citratus*: A phytochemical study focused on antioxidant compounds. *Food Res. Int.* **62**, 684–693

- (2014).
56. Cunha, S. C., Faria, M. a., Sousa, T. & Nunes, E. Isoflavone determination in spontaneous legumes identified by DNA barcodes. *Food Chem.* **134**, 2262–2267 (2012).
 57. Sithisarn, P., Michaelis, M., Schubert-Zsilavecz, M. & Cinatl, J. Differential antiviral and anti-inflammatory mechanisms of the flavonoids biochanin A and baicalein in H5N1 influenza A virus-infected cells. *Antiviral Res.* **97**, 41–48 (2013).
 58. Wang, T. yang, Li, Q. & Bi, K. shun. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian J. Pharm. Sci.* (2017). doi:10.1016/j.ajps.2017.08.004
 59. Nguyen, T. T. H., Moon, Y., Ryu, Y., Kim, Y., Nam, S., Kim, M., Kimura, A. & Kim, D. The influence of flavonoid compounds on the *in vitro* inhibition study of a human fibroblast collagenase catalytic domain expressed in *E. coli*. *Enzyme Microb. Technol.* **52**, 26–31 (2013).
 60. Wu, T., He, M., Zang, X., Zhou, Y., Qiu, T., Pan, S. & Xu, X. A structure-activity relationship study of flavonoids as inhibitors of *E. coli* by membrane interaction effect. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1828**, 2751–2756 (2013).
 61. Zhang, J., Wu, Y., Zhao, X., Luo, F., Li, X., Zhu, H., Sun, C. & Chen, K. Chemopreventive effect of flavonoids from Ougan (*Citrus reticulata* cv. *Suavissima*) fruit against cancer cell proliferation and migration. *J. Funct. Foods* **10**, 511–519 (2014).
 62. Choi, E. J., Kim, T. & Lee, M. S. Pro-apoptotic effect and cytotoxicity of genistein and genistin in human ovarian cancer SK-OV-3 cells. *Life Sci.* **80**, 1403–1408 (2007).
 63. Bang, O. Y., Hong, H. S., Kim, D. H., Kim, H., Boo, J. H., Huh, K. & Mook-Jung, I. Neuroprotective effect of genistein against beta amyloid-induced neurotoxicity. *Neurobiol. Dis.* **16**, 21–28 (2004).
 64. Beekmann, K., Haan, L. H. J., Actis-Goretti, L., Houtman, R., Bladeren, P. J. & Rietjens, I. M. C. M. The effect of glucuronidation on isoflavone induced estrogen receptor (ER) α and ER β mediated coregulator interactions. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **154**, 245–253 (2015).
 65. Furie, M. B. & Brook, S. *An Overview of Inflammation. Pathobiology of Human Disease* (Elsevier Inc., 2014). doi:10.1016/B978-0-12-386456-7.01801-3

66. Gattorno, M. & Martini, A. *Chapter 3- Inflammation and Its Mediators. Textbook of Pediatric Rheumatology*. Elsevier Inc., 2016, 14-32.
67. Jacobs, M. D. & Harrison, S. C. Structure of an I κ B α /NF- κ B complex. *Cell* **95**, 749–758 (1998).
68. Lawrence, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, 1–10 (2009).
69. Karin, M. & Ben-neriah, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: The Control of NF- κ B Activity. *Annu. Rev. Immunol.* 621–663 (2000).
70. Li, Q. & Verma, I. M. NF- κ B regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 725–734 (2002).
71. Jun, J. H., Yoon, W., Seo, S., Woo, K., Kim, G., Ryoo, H. & Baek, J. BMP2-activated Erk/MAP kinase stabilizes runx2 by increasing p300 levels and histone acetyltransferase activity. *J. Biol. Chem.* **285**, 36410–36419 (2010).
72. Ge, C., Xiao, G., Jiang, D., Yang, Q., Hatch, N. E., Roca, H. & Franceschi, R. T. Identification and functional characterization of ERK/MAPK phosphorylation sites in the Runx2 transcription factor. *J. Biol. Chem.* **284**, 32533–32543 (2009).
73. Saxena, R. K., Vallyathan, V. & Lewis, D. M. Evidence for lipopolysaccharide-induced differentiation of RAW264.7 murine macrophage cell line into dendritic like cells. *J. Biosci.* **28**, 129–134 (2003).
74. Knowles, R. G. & Moncada, S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* **298**, 249–58 (1994).
75. Burns, A. & Iliffe, S. Alzheimer's disease. *BMJ* **338**, 158–163 (2009).
76. Drachman, D. A. & Leavitt, J. Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging? *Arch. Neurol.* **30**, 113–21 (1974).
77. Pohanka, M. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor is a target in pharmacology and toxicology. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 2219–2238 (2012).
78. De Ferrari, G. V., Canales, M. A., Shin, I., Weiner, L. M., Silman, I. & Inestrosa, N. C. A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid beta-peptide fibril formation. *Biochemistry* **40**, 10447–57 (2001).
79. Grossberg, G. T. Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease:

- Getting on and staying on. *Curr. Ther. Res. - Clin. Exp.* **64**, 216–235 (2003).
80. Allderdice, P. W., Gardner, H. A. R., Galutira, D., Lockridge, O., LaDu, B. N. & McApLine, P. J. The cloned butyrylcholinesterase (BCHE) gene maps to a single chromosome site, 3q26. *Genomics* **11**, 452–454 (1991).
 81. Giacobini, E. Cholinesterases: New roles in brain function and in Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* **28**, 515–522 (2003).
 82. Hashimoto, M., Rockenstein, E., Crews, L. & Masliah, E. Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neuromolecular Med.* **4**, 21–36 (2003).
 83. Hardy, J. & Allsop, D. Amyloic deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. (1988).
 84. Querfurth, H. W. & LaFerla, F. M. Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **362**, 329–44 (2010).
 85. Jonsson, T., Atwal, J. K., Snaedal, J., Jonsson, P. V., Bjornsson, S., Stefansson, H., Sulem, P., Gudbjartsson, D., Maloney, J., Hoyte, K., Gustafson, A., Liu, Y., Lu, Y., Bhangale, T., Graham, R. R., Huttenlocker, J., Bjornsdottir, G., Andreassen, O. A., Jönsson, E. G., Palotie, A., Behrens, T. W., Magnusson, O. T., Kong, A., Thorsteinsdottir, U., Watts, R. J. & Stefansson, K. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* **488**, 96–9 (2012).
 86. Goedert, M., Spillantini, M. G. & Crowther, R. a. Tau proteins and neurofibrillary degeneration. *Brain Pathol.* **1**, 279–286 (1991).
 87. Khan, M. T. H., Orhna, I., Şenol, F. S., Kartal, M., Şener, B., Dvorská, M., Šmejkal, K. & Šlapetová. Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. *Chem. Biol. Interact.* **181**, 383–389 (2009).
 88. Rauter, A. P., Martins, A., Lopes, R., Ferreira, J., Serralheiro, L. M., Araújo, M. E., Borges, C., Justino, J., Silva, F. V., Goulart, M., Thomas-Oates, J., Rodrigues, J. A., Edwards, E., Noronha, J. P., Pinto, R. & Mota-Filipe, H. Bioactivity studies and chemical profile of the antidiabetic plant *Genista tenera*. *J. Ethnopharmacol.* **122**, 384–393 (2009).

89. Erdemoglu, N., Ozkan, S., Duran, A. & Tosun, F. GC-MS analysis and antimicrobial activity of alkaloid extract from *Genista vuralii*. *Pharm. Biol.* **47**, 81–85 (2009).
90. Hlila, M. B., Mosbah, H., Mssada, K., Jannet, H. B., Aouni, M. & Selmi, B. Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of roots extracts from the Tunisian *Scabiosa arenaria* Forssk. *Ind. Crops Prod.* **67**, 62–69 (2015).
91. Wolfender, J., Garo, E. & Hostettmann, K. Prenylated Flavanones from *Monotes engleri*: On-line structure elucidation by LC/UV/NMR. *Helv. Chim. Acta* **81**, 4–13 (1998).
92. Slade, D., Ferreira, D. & Marais, J. P. J. Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids. *Phytochemistry* **66**, 2177–2215 (2005).
93. Soonthornchareonnon, N., Ubonopas, L., Kaewsuwan, S. & Wuttiudomlert, M. Lupinifolin, a bioactive flavanone from *Myriopteris extensum* (Wight) K. Schum. stem. *Thai J. Phytopharm.* **11**, 19–28 (2004).
94. Chen, Y., Yan, T., Gao, C., Cao, W. & Huang, R. Natural products from the genus *Tephrosia*. *Molecules* **19**, 1432–1458 (2014).
95. Sutthivaiyakit, S., Thongnak, O., Lhinhatrakool, T., Yodchun, O., Srimark, R., Dowtaisong, P. & Chuankamnerdkarn, M. Cytotoxic and Antimycobacterial Prenylated Flavonoids from the Roots of *Eriosema chinense*. *The American Chemical Society* **72**, 1092–1096 (2009).
96. Itoigawa, M., Ito, C., Ju-ichi, M., Nobukuni, T., Ichiishi, E., Tokuda, H., Nishino, H. & Furukawa, H. Cancer chemopreventive activity of flavanones on Epstein-Barr virus activation and two-stage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Lett.* **176**, 25–29 (2002).
97. Magalha, A. F., Ruiz, A. L. T. G., Tozzi, A. M. G. A. & Magalhães, E. G. Dihydroflavonols and flavanones from *Lonchocarpus atropurpureus* roots. *Phytochemistry* **52**, 28–32 (1999).
98. Chavez-uribe, I. & Sousa-sa, M. Flavanones and 3-hydroxyflavanones from *Lonchocarpus oaxacensis*. *Structure* **55**, 953–957 (2000).
99. Mbwapbo, Z. H., Luyengi, L. & Kinghorn, A. D. Phytochemicals: A glimpse into their structural and biological variation. **34**, 335–343 (1996).
100. Reyes-Chilpa, R., Baggio, C. H., Alavez-Solano, D., Estrada-Muñiz, E., Kauffman, F.

- C., Sanchez, R. I. & Mesia-Vela, S. Inhibition of gastric H⁺,K⁺-ATPase activity by flavonoids, coumarins and xanthenes isolated from Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **105**, 167–172 (2006).
101. Agrawal, P. K. *Carbon-13 NMR of Flavonoids*. Elsevier, 1989, 92–114.
 102. Cuyckens, F. & Claeys, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom.* **39**, 1–15 (2004).
 103. Ferreres, F., Gil-Izquierdo, A., Andrade, P. B., Valentão, P. & Tomás-Barberán, F. A. Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1161**, 214–223 (2007).
 104. Rijke, D., Zappey, H., Ariese, F., Gooijer, C. & Brinkman, U. A. Liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry of flavonoids with triple-quadrupole and ion-trap instruments. *J. Chromatogr. A* **984**, 2006 (2003).
 105. Fabre, N., Rustan, I., De Hoffmann, E. & Quetin-Leclercq, J. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **12**, 707–715 (2001).
 106. Vitor, R. F., Mota-Filipe, H., Teixeira, G., Borges, C., Rodrigues, A. I., Teixeira, A. & Paulo, A. Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury. *J. Ethnopharmacol.* **93**, 363–370 (2004).
 107. Ibrahima, R. M., El-Halawany, A., Saleh, D. O., Naggar, E. M. B., El-Shabrawy, A. E. & El-Hawary, S. HPLC-DAD-MS/MS profiling of phenolics from *Securigera securidaca* flowers and its anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic activities. *Brazilian J. Pharmacogn.* **25**, 134–141 (2015).
 108. Giachi, I., Manunta, A. & Morelli, I. Flavonoids and isoflavonoids from *Genista morisii*. **30**, 801–803 (2002).
 109. Majno, G. *Chronic Inflammation. The American Journal of Pathology* **153**, Elsevier Inc., 1998.
 110. Khan, K., Pal, S., Yadav, M., Maurya, R., Kumar, A., Sanyal, S. & Chattopadhyay, N. Prunetin signals via G-protein-coupled receptor, GPR30: Stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated activation of MAPK signaling induces Runx2 expression in

- osteoblasts to promote bone regeneration. *J. Nutr. Biochem.* (2015).
doi:10.1016/j.jnutbio.2015.07.021
111. Byun, E. B., Sung, N., Yang, M., Lee, B., Song, D., Park, J., Kim, J., Jang, B., Choi, D., Park, S., Yu, Y. & Byun, E. Anti-inflammatory effect of gamma-irradiated genistein through inhibition of NF- κ B and MAPK signaling pathway in lipopolysaccharide-induced macrophages. *Food Chem. Toxicol.* **74**, 255–264 (2014).
 112. Baldisserotto, A., Vertuani, S., Bino, A., De Lucia, D., Lampronti, I., Milani, R., Gambari, R. & Manfredini, S. Design, synthesis and biological activity of a novel Rutin analogue with improved lipid soluble properties. *Bioorg. Med. Chem.* **23**, 264–71 (2015).
 113. Procházková, D., Boušová, I. & Wilhelmová, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* **82**, 513–523 (2011).
 114. Razali, N., Razab, R., Junit, S. M. & Aziz, A. A. Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (*Anacardium occidentale*). *Food Chem.* **111**, 38–44 (2008).
 115. Magiera, S., Baranowska, I. & Lautenszleger, A. UHPLC-UV method for the determination of flavonoids in dietary supplements and for evaluation of their antioxidant activities. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **102**, 468–475 (2015).
 116. Wang, J., He, C., Wu, W., Chen, F., Wu, Y., Li, W., Chen, H. & Yin, Y. Biochanin A protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced damage and oxidative stress in a rat model of Parkinson's disease. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* **138**, 96–103 (2015).
 117. Park, C. E., Yun, H., Lee, E., Min, B., Bae, H., Choe, W., Kang, I., Kim, S. & Ha, J.. The antioxidant effects of genistein are associated with AMP-activated protein kinase activation and PTEN induction in prostate cancer cells. *J. Med. Food* **13**, 815–820 (2010).
 118. Pietta, P. G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **63**, 1035–1042 (2000).
 119. Yang, X., Jiang, Y., Yang, J., He, J., Sun, J., CHen, F., Zhang, M. & Yang, B. Prenylated flavonoids, promising nutraceuticals with impressive biological activities. *Trends Food Sci. Technol.* **44**, 93–104 (2015).

120. Stevens, J. F. & Page, J. E. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: To your good health! *Phytochemistry* **65**, 1317–1330 (2004).
121. Zhang, Y. & Chen, W. an. Biochanin A Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Cytokines and Mediators Production in BV2 Microglia. *Neurochem. Res.* **40**, 165–171 (2014).
122. Hämäläinen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M. & Moilanen, E. Anti-inflammatory effects of flavonoids: Genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- κ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- κ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators Inflamm.* **2007**, (2007).
123. Kim, E. K., Kwon, K., Song, M., Seo, S., Park, S., Ka, S., Na, L., Kim, K., Ryu, D., So, H., Park, R., Park, J. & Park, B. Genistein protects pancreatic β cells against cytokine-mediated toxicity. *Mol. Cell. Endocrinol.* **278**, 18–28 (2007).
124. Wu, W. Y., Wu, Y., Huang, H., He, C., Li, W., Wang, H., Chen, H. & Yin, Y. Biochanin A attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses and inhibits the activation of the MAPK pathway in BV2 microglial cells. *Int. J. Mol. Med.* **35**, 391–398 (2015).
125. Zhuang, Z., Ye, G. & Huang, B. Kaempferol Alleviates the Interleukin-1 β -Induced Inflammation in Rat Osteoarthritis Chondrocytes via Suppression of NF- κ B. *Med. Sci. Monit.* **23**, 3925–3931 (2017).
126. Kadioglu, O., Nass, J., Saeed, M. E., Schuler, B. & Efferth, T. Kaempferol is an anti-inflammatory compound with activity towards NF- κ B pathway proteins. **35**, 2645-2650 (2015).
127. García-Mediavilla, V., Crespo, I., Collado, P. S., Esteller, A., Sánchez-Campos, S., Tuñón, M. J. & González-Gallego, J. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the NF- κ B pathway in Chang Liver cells. *Eur. J. Pharmacol.* **557**, 221–229 (2007).
128. Kuhlmann, M. K., Horsch, E., Burkhardt, G., Wagner, M. & Köhler, H. Reduction of cisplatin toxicity in cultured renal tubular cells by the bioflavonoid quercetin. *Arch.*

- Toxicol.* **72**, 536–540 (1998).
129. Da Silva, J., Herrmann, S. M. Heuser, V., Peres, W., Marroni, N. P., González-Gallego, J. & Erdtmann, B. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food Chem. Toxicol.* **40**, 941–947 (2002).
 130. Tak, P. P., Firestein, G. S., Tak, P. P. & Firestein, G. S. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Invest.* **107**, 7–11 (2001).
 131. Ming, X., Ding, M., Zhai, B., Xiao, L., Piao, T. & Liu, M. Biochanin A inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in human umbilical vein endothelial cells. *Life Sci.* **136**, 36–41 (2015).
 132. Feng, G., Sun, B. & Li, T. Z. Daidzein attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway. *Int. Immunopharmacol.* **26**, 392–400 (2015).
 133. Basu, A., Das, Anindhya, S. D., Sharma, M., Pathak, M. P., Chattopadhyay, P., Biswas, K. & Mukhopadhyay, R. STAT3 and NF-κB are common targets for kaempferol-mediated attenuation of COX-2 expression in IL-6-induced macrophages and carrageenan-induced mouse paw edema. *Biochem. Biophys. Reports* **12**, 54–61 (2017).
 134. Ahn, H. & Lee, G.-S. Isorhamnetin and hyperoside derived from water dropwort inhibits inflammasome activation. *Phytomedicine* **24**, 77–86 (2017).
 135. Kato, K., Hayako, H., Ishihara, Y., Marui, S., Iwane, M. & Miyamoto, M. TAK-147, an acetylcholinesterase inhibitor, increases choline acetyltransferase activity in cultured rat septal cholinergic neurons. *Neurosci. Lett.* **260**, 5–8 (1999).
 136. Bagheri, M., Joghataei, M.-T., Mohseni, S. & Roghani, M. Genistein ameliorates learning and memory deficits in amyloid β(1–40) rat model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Learn. Mem.* **95**, 270–276 (2011).
 137. Bagheri, M., Roghani, M., Joghataei, M. T. & Mohseni, S. Genistein inhibits aggregation of exogenous amyloid-beta 1-40 and alleviates astrogliosis in the hippocampus of rats. *Brain Res.* **1429**, 145–154 (2012).
 138. Biradar, S. M., Joshi, H. & Chheda, T. K. Biochanin-A ameliorates behavioural and neurochemical derangements in cognitive-deficit mice for the betterment of Alzheimer's disease. **33**, 369-382 (2014).